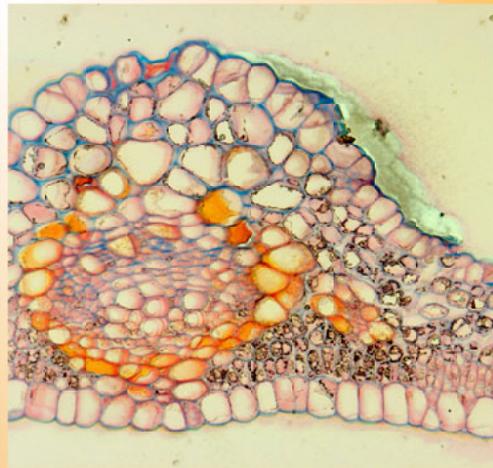
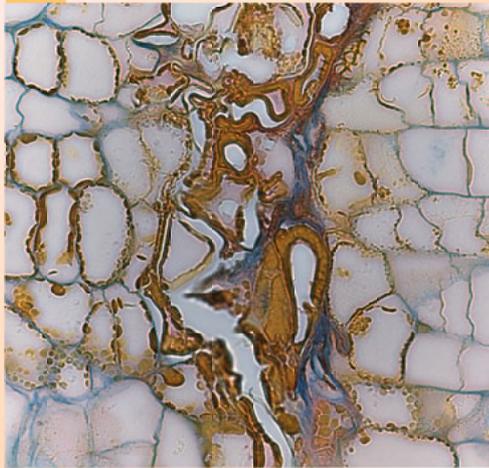


Michael Neumüller

**Die Hypersensibilität
der Europäischen Pflaume
(*Prunus domestica* L.)
gegenüber dem Scharkavirus
(*Plum pox virus*)**



UNIVERSITÄT HOHENHEIM
Fakultät Agrarwissenschaften

Aus dem Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie
Fachgebiet Obstbau

**Die Hypersensibilität
der Europäischen Pflaume
(*Prunus domestica* L.)
gegenüber dem Scharkavirus
(*Plum pox virus*)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften (Dr.sc.agr.)

vorgelegt

der Fakultät Agrarwissenschaften

von

Michael Neumüller

aus Hallbergmoos

2005

Die vorliegende Arbeit wurde am 17. August 2005 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. August 2005

1. Prodekan: Prof. Dr. K. Stahr
Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. J. N. Wünsche
Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. A. J. P. Pfitzner
3. Prüfer: Prof. Dr. M. Kruse

Die Dissertation wurde elektronisch veröffentlicht. Sie kann zum wissenschaftlichen und privaten Gebrauch als Datei im *portable document format* über die Websites der Universität Hohenheim und der Deutschen Bibliothek (Frankfurt am Main/Leipzig) von den jeweiligen Servern abgerufen, auf geeigneten Datenträgern gespeichert, am Bildschirm angezeigt und ausgedruckt werden. Das Urheberrecht liegt beim Verfasser der Arbeit. Jegliche Veränderung des Inhalts der Datei sowie die Verwendung von Teilen der Dissertation für jedwede Art der Veröffentlichung ohne Genehmigung des Autors sind untersagt.

Die Arbeit kann wie folgt zitiert werden:

NEUMÜLLER, M., 2005: Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) gegenüber dem Scharkavirus (*Plum pox virus*). Dissertation Universität Hohenheim, Fakultät Agrarwissenschaften. Online zugänglich unter: <http://www.ub.uni-hohenheim.de/opus/index.html> (Stand: 01.09.2005)

Ein gedrucktes und gebundenes Exemplar der Dissertation kann über ProPrint, den Print-on-demand-Webservice, der aus einem Projekt der Humboldt-Universität Berlin und der Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen mit Unterstützung des Deutschen Forschungsnetzes hervorgegangen ist, angefordert werden (<http://www.proprint-service.de>, Stand: 01.09.2005).

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Einheiten und Abkürzungen	VII
1  Die Bedeutung der Resistenz gegen das Scharkavirus für den Anbau der Europäischen Pflaume	1
1.1 Zur Systematik der Art <i>Prunus domestica</i> L.	2
1.2 Wirtschaftliche Bedeutung des Anbaus der Europäischen Pflaume	3
1.3 Die Scharkavirose und ihre Auswirkungen auf den Anbau der Europäischen Pflaume	4
1.3.1 Der Erreger der Scharkakrankheit, das <i>Plum pox virus</i> (PPV).	4
1.3.1.1 <i>Taxonomie und biophysikalische Eigenschaften</i>	4
1.3.1.2 <i>Aufbau des Scharkavirus</i>	4
1.3.1.3 <i>Genom und Genprodukte</i>	4
1.3.1.4 <i>Virusstämme</i>	6
1.3.1.5 <i>Wirtspflanzen</i>	8
1.3.1.6 <i>Übertragung und Verbreitung</i>	8
1.3.1.7 <i>Virusnachweis</i>	9
1.3.1.8 <i>Verteilung des Virus in der Pflanze</i>	9
1.3.2 <i>Symptomausprägung</i>	10
1.3.2.1 <i>Latenzzeit</i>	10
1.3.2.2 <i>Symptome</i>	10
1.3.3 <i>Wirtschaftliche Schäden durch PPV</i>	12
1.3.3.1 <i>Auswirkungen von Scharkabefall auf die Wirtschaftlichkeit der Obstanlage</i>	13
1.3.3.2 <i>Geographische Verbreitung der Scharkakrankheit</i>	14
1.3.3.3 <i>Bekämpfung der Scharkavirose</i>	15
1.4 Bisherige Bemühungen zur Züchtung scharkaresistenter Sorten	17
1.4.1 Zur Bedeutung des Begriffs „Resistenz“	17
1.4.2 Formen der Virusresistenz	20
1.4.3 Mechanismen der Virusresistenz	23
1.4.3.1 <i>Posttranscriptional gene silencing</i>	23
1.4.3.2 <i>Cross protection</i>	24
1.4.3.3 <i>Hypersensibilitätsreaktion</i>	24

1.4.4	Scharkaresistenzzüchtung.	24
1.4.4.1	Resistenzprüfung.	24
1.4.4.2	Vererbung.	28
1.4.4.3	Bewertung der Resultate der Scharkaresistenzzüchtung.	28
1.4.4.4	Gentransfer zur Gewinnung scharkaresistenter Sorten der Europäischen Pflaume	29
1.5	Notwendigkeit der Nutzung der Hypersensibilitätsresistenz zur Züchtung scharkaresistenter Sorten.	32
1.5.1	Die pflanzliche Hypersensibilitätsreaktion (HR)	32
1.5.1.1	Definition und biologische Funktion	32
1.5.1.2	Ablauf der HR	33
1.5.1.3	Auslösung der HR und genetische Grundlagen	35
1.5.2	Überblick über die Hypersensibilität von <i>Prunus domestica</i> L. gegenüber PPV	37
1.5.3	Zielstellung der Untersuchungen	38
2	Ausprägungsformen der Hypersensibilität gegenüber PPV.	41
2.1	Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften.	42
2.2	Testsysteme	55
2.2.1	Pfropfungen auf scharkainfizierte Bäume im Freiland.	55
2.2.2	Einfluss des Virusisolats und der Inokulationsmethode.	58
2.2.2.1	Einfluss des Virusisolats auf die Auslösung und den Verlauf der HR bei der Sorte 'Jojo'.	58
2.2.2.2	Einfluss des Virusstamms auf die Auslösung und den Verlauf der HR bei Nachkommen der Sorte 'Jojo'.	61
2.2.3	Schlussfolgerungen	61
3	Nachweis und Auswirkungen der hypersensiblen Reaktion gegenüber PPV	63
3.1	Zelltod im Bereich der Veredlungsstelle.	63
3.2	Akkumulation von HR-Indikatoren in der Blattspreite.	69
3.2.1	Superoxidanionen in Mesophyllzellen der Sorte 'Jojo' nach künstlicher Inokulation	69
3.2.2	Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid in der Blattspreite hypersensibler Genotypen	72
3.2.3	Salicylat in der Blattspreite verschiedener Genotypen nach PPV-Inokulation	76
3.2.4	Zusammenfassung	80
3.3	Beobachtungen zur Begrenzung der Virusausbreitung durch die hypersensible Reaktion	81
3.3.1	Virusnachweis mittels Immunogold-Silverstaining	81
3.3.2	Virusnachweis mittels eines rekombinanten, GFP-exprimierenden PPV-Isolats	85
3.3.3	Zusammenfassung	88

4	Vererbung der Hypersensibilität gegenüber PPV	.89
4.1	Material und Methoden	.90
4.2	Ergebnisse und Diskussion	.90
4.2.1	Anteile hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften	.90
4.2.2	Aussagen über die genetische Determinierung der Hypersensibilität gegenüber PPV.	.93
4.2.2.1	<i>Reziprozität</i>	.94
4.2.2.2	<i>Resistenzdonoren</i>	.96
4.2.2.3	<i>Kombinationseignung</i>	.98
4.3	Zusammenfassung	.104
5	Etablierung eines Systems zur Entwicklung von DNA-Markern für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV	.105
5.1	Strategie zum Auffinden von DNA-Markern für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume	.106
5.2	Suche nach DNA-Markern für die Hypersensibilität mittels BSA und AFLP	.107
5.3	Umwandlung von AFLP-Markern in PCR-Marker	.113
5.3.1	Design von Primern für einzelne AFLP-Fragmente	.113
5.3.2	Eignung der Fragmente als CAPS-Marker	.115
5.3.3	Single Nucleotide Polymorphism	.116
5.3.4	Ausblick auf die weitere Vorgehensweise	.119
5.4	Zusammenfassung und Bewertung	.121
6	Zukünftige Nutzung der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV	.123
7	Zusammenfassung	.129
8	Summary	.131
	Quellenverzeichnis	.133
	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	.147
	Danksagung	.151
	Lebenslauf	.153

Verzeichnis der verwendeten Einheiten und Abkürzungen

physikalische und chemische Einheiten

°C	Grad Celsius (Temperatur)
bar	Bar
bp	basepair(s) (Basenpaar(e))
Da	Dalton
g	Gramm (Masse)
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n) (Zeit)
J	Joule (Energie)
K	Kelvin (Temperatur)
l	Liter (Volumen)
lm	Lumen (Lichtstrom)
lx	Lux (Beleuchtungsstärke)
m	Meter (Länge)
M	molare Konzentration (mol/l)
min	Minute(n) (Zeit)
mol	Mol (Stoffmenge)
nt	Nucleotid(e)
Pa	Pascal (Druck)
rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunde(n) (Zeit)
S	Siemens (elektrischer Leitwert)
t	Tonne (Masse)
u	atomare Masseneinheit
U	Enzymaktivität
V	Volt (Spannung)
W	Watt (Leistung)
w/v	weight/volume

Abkürzungen chemischer Stoffe

ACN	Astrablau-Chrysoidin-Neufuchsin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BSA-c	acetyliertes Rinderserumalbumin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
GTP	Guanosintriphosphat
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PBS	phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
SA	salicylic acid, Salicylsäure
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indol-β-D-galactopyranosid

Anmerkungen zur Terminologie

Der Begriff „*chip budding*“ wird synonym zur Bezeichnung „Rindenspanveredlung“ verwendet, ebenso der Ausdruck „*Chip*“ für „Rindenspan“.

Wörter, die Fremdsprachen entlehnt sind, sind im laufenden Text *kursiv* gesetzt (z. B. *in vitro*, *bulk*).

sprachliche Vereinfachungen

Abb.	Abbildung	k. A.	keine Angaben
AFLP	amplified fragment length polymorphism	Nr.	Nummer
Aufl.	Auflage	PCD	programmed cell death
BSA	bulk(ed) segregant analysis	PCR	polymerase chain reaction
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequence	Pflz.	Pflanze
cf.	confer (lat. conferre=vergleichen)	PPV	Plum pox virus
d. h.	das heißt	RAPD	random amplified polymorphic DNA
ebda.	ebenda (Bezug auf die letztgenannte Literaturangabe)	RFLP	restriction fragment length polymorphism
ELISA	enzyme-linked immuno(ad)sorbant assay	RGA	resistance gene analogue
f.	folgende(r/s)	RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
ff.	folgende	s.	siehe
Fa.	Firma	S.	Seite
HI	Hypersensibilitätsindex $\in [0; 1]$	SAR	systemic acquired resistance
HK	Hypersensibilitätsklasse $\in \{0; 1; 2; 3\}$	SCAR	sequence characterized amplified region
Hoh 4517	Zuchtklon von <i>Prunus domestica</i> aus dem Hohenheimer Genpool mit der (hier exemplarischen) vierstelligen Zuchtnummer 4517	SNP	single nucleotide polymorphism
HR	hypersensitive response hypersensible Reaktion	SSCP	single strand conformation polymorphism
i. d. R.	in der Regel	Tab.	Tabelle
		TSD	Triebspitzendürre
		u. U.	unter Umständen
		z. B.	zum Beispiel
		ZV	Zwischenveredlung

1 Die Bedeutung der Resistenz gegen das Scharkavirus für den Anbau der Europäischen Pflaume

In der Gattung *Prunus* finden sich ökonomisch bedeutende Obstarten, darunter die Süß- (*Prunus avium* L.) und Sauerkirsche (*Prunus cerasus* L.), der Pfirsich (*Prunus persica* (L.) BATSCH), die Aprikose (*Prunus armeniaca* L.) und die Gruppe der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) mit Pflaume, Zwetsche, Reneklode und Mirabelle. Außerdem zählen als Wildobst oder als Unterlagen für Steinobst verwendete Gehölze wie die Schlehe (*Prunus spinosa* L.) und die Kirschkpflaume oder Myrobalane (*Prunus cerasifera* L.) zu dieser Gattung. Alle genannten Arten werden vom Scharkavirus (Plum pox virus¹, PPV) befallen (KEGLER et al. 1998). Die Entwicklung von Sorten, die gegen PPV resistent sind, beschäftigt die Züchter, seitdem die Viruserkrankung 1933 von ATANASOFF erstmals beschrieben wurde.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer speziellen Form der Resistenz der Europäischen Pflaume gegen das Scharkavirus, der Resistenz durch Hypersensibilität. Hypersensibilität ist der mit der Auslösung von Pathogenab-

wehrprozessen eng verknüpfte programmierte Zelltod (HEATH 2000). Es werden Aussagen zu Ausprägungsformen der Hypersensibilität, zur Vererbung, zur Histochemie der pflanzlichen Abwehr des Virusbefalls und zur Entwicklung von molekularen Markern für das Merkmal Hypersensibilität gegenüber PPV getroffen.

Einführend soll ein Überblick über die Scharkakrankheit und ihre Bedeutung für die Kultur der Europäischen Pflaume gegeben werden. Daraus wird die Notwendigkeit der Züchtung resistenter Sorten ersichtlich. Dabei wird ein Aufriss über das bisher in der Züchtung Erreichte und Ausstehende gegeben. Schließlich werden verschiedene Formen der Resistenz aufgezeigt. Diese Thematik einschließlich der Terminologie, die dabei verwendet wird, wird detailliert behandelt. Es scheint nämlich notwendig, die Scharkaresistenz in den Kontext neuerer Erkenntnisse zum pflanzlichen Resistenzverhalten zu stellen. Ein derartiger Versuch ist in dieser Form ausstehend. Diese Überlegungen führen hin zur Besprechung der Hypersensibilitätsreaktion und ihrer Rolle beim Virusresistenzverhalten von Vertretern der Europäischen Pflaume. Dabei wird auf den Nutzen der Hypersensibilität für die Scharkaresistenzzüchtung hingewiesen.

Zuvor wird die Gruppe der Europäischen Pflaume in ihrer Stellung im botanischen System kurz dargestellt und ihre ökonomische Bedeutung bewertet.

1 Gemäß der Bestimmungen des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) wird nur der erste Bestandteil des Virusnamens groß geschrieben, es sei denn, der Virusname beinhaltet Eigennamen. Der gesamte Virusname wird kursiv gesetzt, wenn damit die Stellung des Virus im taxonomischen System bezeichnet wird. In allen anderen Fällen wird kein Kursivdruck verwendet (VAN REGENMORTEL 2002).

1.1 Zur Systematik der Art *Prunus domestica* L.

Die Taxonomie der Art *Prunus domestica* L. innerhalb der Familie der *Rosaceae*, der Unterfamilie *Prunoideae* und der Gattung *Prunus* ist umstritten. Nach HEGI (1906) zählt diese Art zur Untergattung *Prunophora*, die sich in die beiden Sektionen *Prunocerasus* und *Euprunus* gliedert. Letzterer gehören die vornehmlich in Europa angebauten Sorten an. Diese werden von HEGI in der Art *Prunus domestica* zusammengefasst.

RÖDER (1939) unterstützt die von RYBIN (1936) vertretene Auffassung, eine weite Umgrenzung der Art *Prunus domestica* vorzunehmen und darin eine „Zusammenfassung der von einander recht verschiedenen (europäischen) Kulturrassen [zu] sehen“. Er unterteilt die Art in drei Subspezies:

- *Prunus domestica* ssp. *insititia* mit Spillingen und Mirabellen,
- *Prunus domestica* ssp. *italica* mit Rundpflaumen, Halbzwetschen, Eierpflaumen, Ovalpflaumen und Dattelzwetschen
- und *Prunus domestica* ssp. *oeconomica*, den Zwetschen.

JOHANNSON und OLDÉN (1962) stellen gemeinsam mit SCHMIDT (1954) die verschiedene-seits vorgenommene Abgrenzung zwischen einzelnen Unterarten von der Beobachtung aus in Frage, dass Sämlinge, die aus Selbstungen eines der Art *Prunus domestica* ssp. *insititia* zugeordneten Baumes entstanden waren, eine sehr hohe Variabilität hinsichtlich ihrer inneren und äußeren Fruchtmerkmale aufwiesen und somit verschiedenen Subspezies im Sinne von RÖDER zugeordnet werden konnten. Sie schlagen vor, den bisher verwendeten Unterarten lediglich den Status einer nach Fruchtmerkmalen vorgenommenen Einteilung zukommen zu lassen. Eine vergleichbare Klassifizierung ist in der Obstsortenkunde des Apfels mit Begriffen wie „Kalville“ oder „Renetten“ gebräuchlich. Auch dort werden diese nicht als Subspezies betrachtet. SCHMIDT (1954) folgert aus seinen Züchtungsergebnissen

die „Unhaltbarkeit der alten pomologischen Gruppeneinteilung der Pflaumen vom genetischen Standpunkt der Betrachtung“ her. Morphologische, biochemische oder cytogenetische Unterschiede, welche die Bildung von Subspezies rechtfertigen würden, konnten auch in neuerer Zeit nicht nachgewiesen werden. Deshalb ist auch die obig genannte Einteilung der Art *Prunus domestica* in drei Unterarten nicht gerechtfertigt.

Die Gruppe der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) umfasst demnach die Pflaume, Zwetsche, Reneklode und Mirabelle. (Lediglich die Mirabelle wird auch in neuerer Literatur oftmals als eigene Art *Prunus insititia* geführt.) All ihre Vertreter sind hexaploid ($2n=6\times=48$) und unterscheiden sich damit von ihren nächsten Verwandten, der diploiden Myrobalane oder Kirschpflaume (*Prunus cersifera* ERH.) ($2n=2\times=16$) und der tetraploiden Schlehe (*Prunus spinosa* L.) ($2n=4\times=32$) (RYBIN 1936). Die Europäische Pflaume wird als Hybride zwischen Myrobalane und Schlehe angesehen (Erstbericht von CRANE und LAWRENCE 1931, experimentell bestätigt von RYBIN 1936), wenngleich diese Annahme vereinzelt in Frage gestellt wird (ERYOMINE 1991, SALESSES und BONNET 1994). Als Ursprungsgebiete gelten Vorderasien und Osteuropa (RYBIN 1936).

Im deutschen Sprachgebrauch ist im Norden des Landes die Bezeichnung „Pflaume“ für die gesamte *Domestica*-Gruppe ohne der Mirabelle gebräuchlich. Im Süden wird unterschieden zwischen „Pflaumen“ mit zumeist weichfleischigen, säurearmen, runden und „Zwetschen“ mit geschmacklich meist höherwertigen, neben Zucker auch ausreichend Säure aufweisenden, festen, oftmals länglichen Früchten. Renekloten sind als besonders saftige und aromatische Pflaumen aufzufassen. Mirabellen besitzen kleine, zuckerreiche, aromatische, runde Früchte.

Nachfolgend wird der Begriff „Europäische Pflaume“ als Synonym für die Art *Prunus domestica* mit Pflaume, Zwetsche, Reneklode und Mirabelle benutzt.

1.2 Wirtschaftliche Bedeutung des Anbaus der Europäischen Pflaume

Über die Erzeugermärkte wurden in Deutschland im Durchschnitt der Jahre 2000 bis 2003 32000t Pflaumen, Zwetschen, Mirabellen und Renekloden aus heimischem Anbau vermarktet. Dabei wurde ein Erlös von 19,5 Millionen Euro erzielt. Damit ist die europäische Pflaume nach dem Apfel die wirtschaftlich bedeutendste Baumobstart in Deutschland (ELLINGER 2004).

Ein wesentlich größerer Anteil der deutschen Produktion stammt aus dem Anbau für Direktvermarktung sowie aus dem Streuobstbau und aus Hausgärten. So lag die Gesamterntemenge für die Europäische Pflaume im Schnitt der gleichen Jahre bei 433000t und erreichte damit etwa 22% der deutschen Apfelproduktion (1990000t) (FAOSTAT 2004). Über Erzeugermärkte wurde demnach weniger als ein Zehntel der Gesamtproduktion in Umlauf gebracht.

Innerhalb der Europäischen Union (EU) werden in Deutschland mit 32% der Gesamterntemenge mit Abstand am meisten Pflaumen, Zwetschen, Renekloden und Mirabellen erzeugt, es folgen in abnehmender Bedeutung Frankreich, Spanien und Italien (FAOSTAT 2004, s. Tab. 1.2–1). Bezogen auf den Marktanbau verzeichnet Deutschland in der letzten Dekade den stärksten Zuwachs in der Produktion innerhalb der EU-Länder (ELLINGER 2004).

Weltweit wurden von 2001 bis 2004 jährlich durchschnittlich 9,44 Millionen t Pflaumen (einschließlich Japanischer Pflaume) erzeugt. Damit ist die Gruppe der Europäischen und Japanischen Pflaume nach dem Pfirsich (incl. der Nektarine), von dem im Mittel 14,91 Millionen t produziert wurden, mit Abstand die bedeutendste unter den Steinobstarten (ELLINGER 2004, FAOSTAT 2004). Deutschland ist nach China, den USA und Rumänien das viertgrößte Erzeugerland. Vor allem in China, aber auch in den USA hat allerdings der Anbau der Japanischen Pflaume einen hohen Stellenwert, während in den beiden europäischen Ländern fast ausschließlich die Europäische Pflaume erzeugt wird.

Tab. 1.2–1 Jährlich produzierte Menge an Europäischer Pflaume^a in den Ländern der EU^b im Durchschnitt der Jahre 2001 bis 2004 (FAOSTAT 2004)

Land	Produktion [t]	Anteil [%]
Deutschland	435294	32,04
Frankreich	254537	18,73
Spanien	177834	13,09
Italien	161254	11,87
Polen	113586	8,36
Österreich	63804	4,70
Ungarn	57285	4,22
Tschechien	28821	2,12
Portugal	14878	1,10
Großbritannien	14375	1,06
Griechenland	7938	0,58
Slowakei	7729	0,57
Niederlande	5750	0,42
Slowenien	5261	0,39
Lettland	2782	0,20
Estland	2397	0,18
Litauen	1889	0,14
Zypern	1100	0,08
Dänemark	600	0,04
Luxemburg	543	0,04
Belgien	525	0,04
Schweden	471	0,03
Summe	1358650	100,00

- a In der Statistik sind die im Marktanbau, für die Direktvermarktung, im Streuobstbau und im Hausgarten geernteten Mengen berücksichtigt. Sie umfasst außer der Gruppe der Europäischen Pflaume (Pflaume, Zwetsche, Mirabelle und Reneklode) auch die Schlehe (*Prunus spinosa*), die aber nur in vergleichsweise unbedeutenden Mengen produziert wird.
- b Eingeschlossen sind die im Mai 2004 beigetretenen Länder. Aus Finnland, Irland und Malta liegen keine Daten vor. Im Nicht-EU-Mitgliedsland Schweiz wurden zum Vergleich durchschnittlich 7222t Europäischer Pflaumen jährlich erzeugt.

1.3 Die Scharkavirose und ihre Auswirkungen auf den Anbau der Europäischen Pflaume

Krankheitssymptome an Steinobst, die aus späterer Sicht als Folgen des Befalls mit dem Scharkavirus zu deuten waren, wurden erstmalig von bulgarischen Obstbauern in den Jahren 1917/1918 an Bäumen der Zwetschensorte 'Kustendil' ('Hauszwetsche') beobachtet (ATANASOFF 1933 und 1935). ATANASOFF kommt das Verdienst zu, die virale Natur des Erregers dieser Symptome erkannt zu haben. Zugleich beobachtete er, dass die von ein und demselben infektiösen Agens hervorgerufene Krankheit auch an Pfirsich, Aprikose, Süß- und Sauerkirsche auftritt. Seither sind die Scharkavirose und ihr Erreger, das Plum pox virus, weltweit Gegenstand intensiver Forschung. Nachfolgend soll ein Überblick über den gegenwärtigen Stand des Wissens über das Scharkavirus gegeben werden.

1.3.1 Der Erreger der Scharkakrankheit, das *Plum pox virus* (PPV)

1.3.1.1 Taxonomie und biophysikalische Eigenschaften

Die Scharkakrankheit wird vom *Plum pox virus* (PPV) hervorgerufen, das zur Gattung *Potyvirus* innerhalb der Familie der *Potyviridae* gehört (LÓPEZ-MOYA und GARCÍA 1999). Als Synonym ist der Name „Scharkavirus“ (engl. „*Sharka virus*“) gebräuchlich (EPPO 2004).

Über die biophysikalischen Eigenschaften von PPV existieren verschiedene Angaben, die sich je nach Virusisolat und Wirtspflanze, aus der die zu ihrer Bestimmung verwendeten Viren gewonnen werden, stark unterscheiden. Der thermale Inaktivierungspunkt wird zwischen 45 und 58°C, der Verdünnungsendpunkt zwischen $4 \cdot 10^{-1}$ und $8 \cdot 10^{-1}$ und die biologische Stabilität *in vitro* zwischen 10 und 80 Stunden angegeben (NÉMETH 1986).

1.3.1.2 Aufbau des Scharkavirus

Das Plum pox virus ist filamentös mit einer Länge von ca. 750 nm und einem Durchmesser von etwa 15 nm; die Proteinhülle, welche die virale RNA umgibt, besteht aus bis zu 2000 gleichartigen Capsomeren (EPPO 2004). Im Virion sind zwei Proteine, das Hüllprotein und das genome-linked viral protein (VPg) (s. u.), nachweisbar (SHUKLA et al. 1994). Die Proteinsequenz des Hüllproteins ist für mehrere Scharkavirustämme und -isolate (s. Kapitel 1.3.1.4 „Virusstämme“ auf S. 6) bekannt (z. B. LAIN et al. 1989, MAISS et al. 1989, RIECHMANN et al. 1989, TEYCHENEY et al. 1989). Auf der Quartärstruktur des Capsids, die letztlich auf der Primärstruktur, also der Aminosäureabfolge der Capsomere beruht, basiert der auf serologische Methoden gestützte Virusnachweis (MYRTA et al. 1998).

1.3.1.3 Genom und Genprodukte

Das Genom des Scharkavirus besteht aus einem einsträngigen RNA-Strang positiver Orientierung mit ca. 9800 nt; am 5'-terminalen Ende ist es mit einem genome-linked protein (VPg) verbunden (MAISS et al. 1989, RIECHMANN et al. 1989). Die RNA enthält einen langen open reading frame (ORF), der in ein Polyprotein der Masse 355,5 kDa translatiert wird (RIECHMANN et al. 1991). Dieses Polyprotein wird – wie auch bei anderen Vertretern der Gattung *Potyvirus* – durch Spaltung von Peptidbindungen in verschiedene Proteine prozessiert (LÓPEZ-MOYA et al. 2000). Abb. 1.3–1 gibt einen Überblick über die Organisation des Scharkavirusgenoms.

Die Proteine P1 und HC wirken autokatalytisch bei ihrer Abspaltung vom Polyprotein am C-terminalen Ende (GARCÍA et al. 1993, RAVELONANDRO et al. 1993). Für die Prozessierung von P1 wird ein nicht-viraler, also von der Pflanze bereitgestellter Co-Faktor als essentiell angenommen (GARCÍA et al. 1993). Das Protein NIa katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen an sieben definierten Stellen.

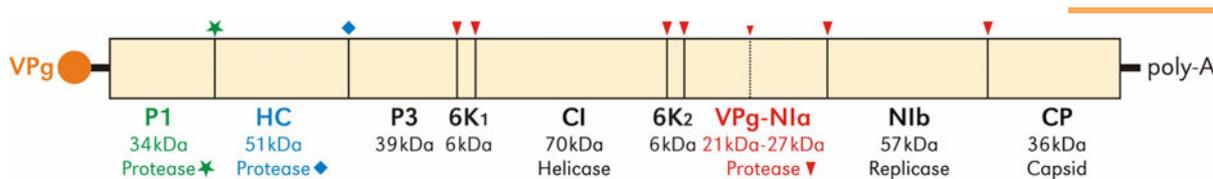


Abb. 1.3–1 Genomkarte des Plum pox virus (aus LÓPEZ-MOYA et al. 2000, © 2000 Elsevier, mit freundlicher Genehmigung). An die virale RNA, dargestellt als dicke schwarze Linie, ist am 5'-Ende kovalent das VPg (genome-linked viral Protein) gebunden. Der virale open reading frame (ORF), symbolisiert als gelblicher Kasten, codiert für ein Polyprotein, das in folgende Proteine prozessiert wird: P1: first protein, HC: helper component, P3: third protein, CI: cylindrical cytoplasmatic inclusion protein, N1a: small nuclear inclusion protein (enthält am N-terminalen Ende das VPg), N1b: large nuclear inclusion protein, CP: coat protein, 6K_{1/2}: Proteine mit einer Masse von 6 kDa. Die Masse und eine der Funktionen der jeweiligen Proteine sind in der Darstellung angegeben. Die senkrechten Linien markieren die Proteinaschnittstellen; die darüber befindlichen Symbole geben an, welches Enzym die Hydrolyse der Peptidbindung katalysiert; der kleinere Pfeil deutet auf suboptimale oder partielle Proteolyse hin.

Funktionen der einzelnen Proteine. Wie bei den meisten Vertretern der *Potyviridae* erfüllen die von der viralen RNA codierten Proteine beim Plum pox virus folgende Funktionen (GARCÍA et al. 1993, RAVELONANDRO et al. 1993, SHUKLA et al. 1994, GARCÍA et al. 1994, LÓPEZ-MOYA et al. 2000, SÁENZ et al. 2002):

- **P1 (first protein):** Serin-Proteinase, Autokatalyse der Hydrolyse des P1-Proteins vom HC-Protein, vermutet wird eine Beteiligung beim Zell-zu-Zelltransport der viralen RNA.
- **HC (helper component):** Cystein-Proteinase, spielt eine entscheidende Rolle bei der Übertragung der Viren über Blattläuse. Angenommen wird eine Mitwirkung des HC-Proteins bei der Bindung des Virions an Strukturen der Mundwerkzeuge von Aphiden. Zudem gibt es Hinweise auf die Beteiligung an der Fähigkeit des Virus zur systemischen Infektion der Pflanze (Langstreckentransport des Virus im Leitungsgewebe).
- **P3 (third protein)** und **6K₁**: Funktion unklar, bislang nicht sicher in PPV-infizierten Pflanzen nachgewiesen. SÁENZ et al. (2000) berichten über Determinanten, welche die Stärke der Symptomausprägung bei *Nicotiana clevelandii* beeinflussen und auf Genabschnitten liegen, die für die beiden genannten Proteine codieren.
- **CI (cylindrical cytoplasmatic inclusion protein):** RNA-Helicase, mit Nucleotidtriphosphat-Bindungsstelle; vermutet wird eine Beteiligung bei der Replikation der viralen RNA und bei der lokalen Virusausbreitung über plasmodesmatische Verbindungen. Bildet zylindrische cytoplasmatische Inklusionen.
- **N1a (small nuclear inclusion protein):** Protease, die mit 7 Schnittstellen an der Proteolyse des Polyproteins beteiligt ist (s. Abb. 1.3–1). Durch Proteolyse wird vom N1a-Protein das VPg abgespalten, das ans 5'-terminale Ende der viralen RNA kovalent bindet. Über die Funktionalität des VPg bei PPV herrscht Unklarheit. Für die Infektiosität spielt es keine Rolle.
- **N1b (large nuclear inclusion protein):** formt zusammen mit N1a die kristallinen nukleären Inklusionen und stellt die RNA-abhängige RNA-Polymerase dar.
- **CP (coat protein):** bildet die Capsomere, die sich zum vollständigen Capsid zusammensetzen, welches das virale Genom umgibt. Das CP besteht aus einer zentralen, konservierten Region, die N- und C-terminal von variablen Regionen flankiert ist. Das N-terminale Ende spielt eine Rolle bei der Virusausbreitung von Zelle zu Zelle. Dem Capsomer kommt natürlicherweise eine Rolle bei der Vektorübertragbarkeit des Virus zu.

Die Replikation der viralen RNA wird membrangebunden im Cytoplasma vermutet. Die Bedeutung der cytoplasmatischen und nucleären Inklusionen bei der Replikation ist unklar. Bemerkenswert ist, dass Proteine, die alle an der Replikation der viralen RNA beteiligt sind, in unterschiedlichen Strukturen und Kompartimenten aggregieren (z. B. CI im Cytoplasma und NIa/NIb im Zellkern) (GARCÍA et al. 1994).

1.3.1.4 Virusstämme

Es sind zahlreiche Isolate des Scharkavirus bekannt, die sich hinsichtlich ihrer biologischen und epidemiologischen Eigenschaften voneinander unterscheiden (Virulenz, Übertragbarkeit durch Aphiden, Symptomausprägung). Die Isolate werden den folgenden bislang bekannten Stämmen zugeordnet:

1 D-Stamm (Dideron) (PPV-D)

(KEGLER et al. 1998, MYRTA et al. 1998, EPPO 2004, JARAUSCH et al. 2004)

- vor allem bei Europäischer Pflaume und Aprikose bedeutsam
- in Mittel- und Westeuropa sowie einigen Mittelmeerländer am meisten verbreitet

2 M-Stamm (Marcus) (PPV-M)

(KEGLER et al. 1998, MYRTA et al. 1998, EPPO 2004, JARAUSCH et al. 2004)

- verbreitet sich schneller als der D-Stamm
- größte Bedeutung beim Pfirsich, befällt aber auch die Europäische Pflaume
- ruft meist stärkere Symptome hervor als der D-Stamm
- hauptsächlich in Süd- und Osteuropa verbreitet, kommt aber auch in Westeuropa vor

3 EA-Stamm (El Amar) (PPV-EA)

(EPPO 2004)

- in Ägypten an Aprikose entdeckt
- Verbreitung bislang auf Ägypten beschränkt

4 C-Stamm (cherry) (PPV-C)

(KALASHYAN et al. 1994, FANIGLIULO et al. 2003, FANIGLIULO et al. 2004)

- befällt Süß- und Sauerkirsche
- Isolat aus Süßkirsche nachgewiesen in Moldawien, Italien, Russland, Ungarn, Bulgarien, Rumänien und Tschechien
- Isolate aus Sauer- und Süßkirschen konnten auf Sorten von *Prunus domestica* übertragen werden

5 rekombinanter Stamm (PPV-Rec)

(GLASA et al. 2004)

Die Zuordnung zu den unter 1 bis 4 benannten Stämmen erfolgte ursprünglich aufgrund von Unterschieden in den serologischen Eigenschaften des Hüllproteins. Diese beruhen auf Unterschieden in der Sequenz des CP-Gens, was später die Stammzuordnung mit molekularbiologischen Methoden ermöglichte. Untersuchungen verschiedener Virusisolate, die sich auf größere Genomabschnitte als das CP-Gen bezogen, führten zum Nachweis eines weiteren Virusstammes, PPV-Rec.

- entstanden aus einem Rekombinationsereignis zwischen PPV-M und PPV-D im NIb-Gen
- über ganz Zentral- und Südosteuropa verbreitet (Slowakei, Tschechien, Deutschland, Albanien, Bulgarien, Ungarn)
- befällt vor allem die Europäische Pflaume und Aprikose
- natürliche Übertragung auf Pfirsiche ist möglich, aber selten
- Etliche der bislang dem D- und M-Stamm zugeordneten Isolate gehören zum rekombinanten Stamm

Abb. 1.3–2 gibt einen Überblick über die von GLASA et al. (2004) vorgeschlagene Einteilung der PPV-Stämme und ihren phylogenetischen Stammbaum. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese Zuordnung auf der Sequenzierung eines Genomabschnittes der verschiedenen Isola-

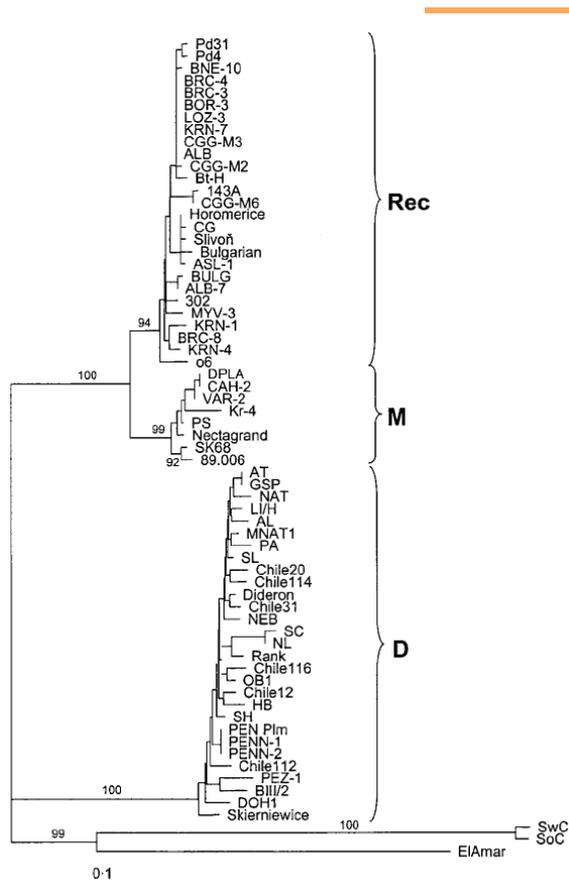


Abb. 1.3-2 Phylogenetischer Baum verschiedener PPV-Isolate basierend auf der Nukleotidsequenz der hypervariablen N-terminalen Region des Hüllproteins. Die mit Ortsangaben oder Codes benannten Virusisolate sind den fünf postulierten Stämmen zugeordnet (aus GLASA et al. 2004, © 2004 by Society for General Microbiology, mit freundlicher Genehmigung).

te beruht, also nicht das gesamte Genom der Isolate erfasst.

- 6 2003 berichten JAMES et al. über ein neues und ungewöhnliches PPV-Isolat in Kanada. Nach Vergleich des Genoms mit anderen Isolaten ziehen sie den Schluss, dass es sich beim Isolat W3174 um den Repräsentanten eines neuen PPV-Stammes handeln muss; vermutlich gelangte das Virusisolat über eine osteuropäische Baumschule nach Nordamerika (JAMES und VARGA 2004). Eine Namensbezeichnung für den neuen Stamm ist bislang nicht festgelegt.

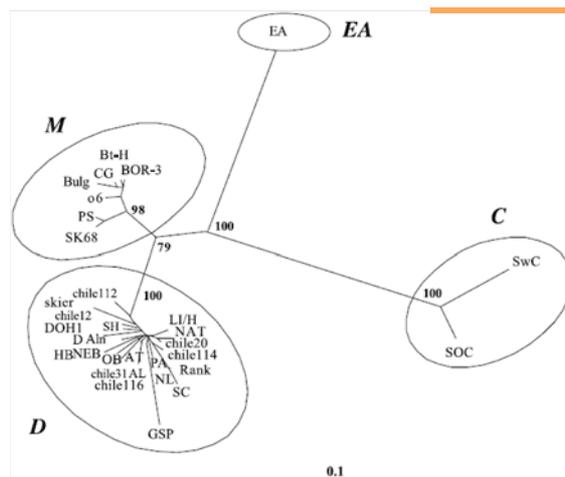


Abb. 1.3-3 Phylogenetische Analyse einiger PPV-Isolate, basierend auf den Genprodukten des für P3 und 6K₁ codierenden Genomabschnittes (aus FANIGLIULO et al. 2003, © 2003 by Springer Verlag, mit freundlicher Genehmigung).

Abb. 1.3-3 gibt einen Überblick über die Zuordnung verschiedener PPV-Isolate zu den einzelnen Stämmen. Deutlich wird, dass sowohl PPV-EA als auch PPV-C nur wenige Vertreter umfassen und als stammesgeschichtlich von PPV-M und PPV-D relativ weit entfernt einzustufen sind. Obwohl sie sich auf einen anderen Abschnitt im Virusgenom beziehen, kommen auch GLASA et al. (2004) zu diesem Schluss. Dies ist aus Abb. 1.3-2 ersichtlich, wobei hier die neu eingeführte Zuordnung zu PPV-Rec hinzukommt. PPV-D, PPV-M und PPV-Rec bilden die bedeutenden Stämme, während die Verbreitung, die Dichte des Vorkommens und damit auch die wirtschaftliche Bedeutung der Isolate, die PPV-EA und PPV-C zuzuordnen sind, gering sind.

In jüngster Zeit wird von einem weiteren atypischen PPV-Isolat aus der Türkei berichtet, das mit hoher Wahrscheinlichkeit aus mehreren Rekombinationsereignissen zwischen Vertretern mindestens zweier Stämme entstanden ist (GLASA und CANDRESSE 2005). Dieser und in Zukunft zu erwartende Funde atypischer PPV-Isolate lassen ein erweitertes Verständnis der Evolution des Scharkavirus erwarten.

1.3.1.5 Wirtspflanzen

Das Plum pox virus befällt eine Vielzahl krautiger und verholzender Pflanzen. Wirtschaftlichen Schaden ruft es bei Obstgehölzen der Gattung *Prunus* hervor. NÉMETH (1986) gibt einen detaillierten Überblick über die Wirtspflanzen des Scharkavirus. Für experimentelle Zwecke werden sehr häufig *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Pisum sativum* und *Chenopodium foetidum* verwendet (EPPO 2004). Viele der Wirtspflanzen kommen als Unkräuter und Ungräser in Obstanlagen vor, jedoch konnte eine Übertragung von krautigen Pflanzen auf Obstgehölze durch Vektoren unter natürlichen Bedingungen nie nachgewiesen werden (KEGLER und HARTMANN 1998).

Hier sollen lediglich die Wirtspflanzen aufgezählt werden, die als Edelsorten oder Unterlagen für Obstgehölze oder als Ziergehölze in Mitteleuropa Verwendung finden (NÉMETH 1986, KEGLER und HARTMANN 1998, EPPO 2004): *Prunus armeniaca*, *Prunus avium*, *Prunus bessey*, *Prunus cerasifera*, *Prunus cerasifera* × *munsoniana* 'Marianna', *Prunus cerasus*, *Prunus domestica* (s. Kapitel 1.1 „Zur Systematik der Art *Prunus domestica* L.“ auf S. 2), *Prunus dulcis*, *Prunus glandulosa*, *Prunus mahaleb*, *Prunus persica*, *Prunus salicina*, *Prunus spinosa*, *Prunus tomentosa*, *Prunus triloba*. Je nach Wirtspflanze bestehen virusstammspezifische Unterschiede in der Anfälligkeit und Symptomausprägung. So können Isolate der Stämme PPV-D und PPV-M nicht systemisch *Prunus avium* und *Prunus cerasus* infizieren (FANIGLIULO et al. 2003 und 2004).

1.3.1.6 Übertragung und Verbreitung

Natürliche Übertragung. Das Scharkavirus wird in der Natur nichtpersistent von Blattläusen übertragen (KRCZAL und KUNZE 1972). Zu den wichtigsten Arten, die als effektive Vektoren fungieren, zählen die Große (*Brachycaudus helichrysi* KALT.) (CHRISTOFF 1947) und Kleine (*Brachycaudus cardui* L.) (KUNZE und KRCZAL 1971) Pflaumenblattlaus, die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae* SULZ.) (KASSANIS und SUTIC 1965) und die Hopfenblattlaus (*Phorodon humili*

(SCHRK.) PASS.) (VACLAV 1960). Die Schwarzgefleckte (*Appelia schwartzi* C. B.) und die Mehlig (Hyalopterus amygdali BLANCH.) Pfirsichblattlaus sowie die Mehlig Pflaumenblattlaus (*Brachycaudus pruni* (GEOFFR.) KOCH) sind keine Vektoren des Scharkavirus (KRCZAL und KUNZE 1972). Die Aquisitionssaugzeit beträgt 5 bis 10 Minuten, danach kann der Vektor das Virus eine, bei dazwischenliegender Hungerperiode (z. B. Flugzeit beim Verlassen der kranken Pflanze) bis zu drei Stunden lang übertragen (KRCZAL und KUNZE 1972).

Wichtig für die Fähigkeit des Virus, durch Blattläuse übertragen werden zu können, ist die Struktur der Virushülle und der Aufbau des HC-Proteins (s. Kapitel 1.3.1.3 „Genom und Genprodukte“ auf S. 4) (SHUKLA et al. 1994, GARCÍA et al. 1994, LÓPEZ-MOYA et al. 1995).

Künstliche Übertragung. Zudem ist eine Übertragung durch Veredlung und mechanische Inokulation möglich; letztere ist erfolgreich von verholzenden auf krautige und zwischen krautigen Pflanzen, im Allgemeinen aber nicht von krautigen auf verholzende Gewächse (NÉMETH 1986, MARTÍNEZ-GÓMEZ et al. 2000). Lediglich PPV-C konnte durch mechanische Inokulation auf sehr junge Sämlinge von *Prunus mahaleb* bzw. *in vitro* vermehrte Sämlinge der Süßkirschensorte 'Van' (*Prunus avium*) übertragen werden (BOEGLIN et al. 2004 bzw. FANIGLIULO et al. 2004). Womöglich ist eine mechanische Übertragung auch bei der Europäischen Pflaume möglich, sofern sehr junge, juvenile Pflanzen verwendet werden.

Von einer Übertragung durch Pollen wurde zunächst berichtet (COMAN und COCIU 1976), sie konnte aber später nicht bestätigt werden (NÉMETH 1986). Über die Samenübertragbarkeit gibt es widersprüchliche Angaben, zumindest für *Prunus domestica* wird sie von den meisten Autoren ausgeschlossen (COMAN und COCIU 1976, ROY und SMITH 1994, HARTMANN 1990, KEGLER und HARTMANN 1993, KEGLER und HARTMANN 1998).

Verbreitung. Die natürliche Verbreitung in der Obstanlage erfolgt über Blattläuse. Ausgehend von wenigen infizierten Obstgehölzen und ab-

hängig von der Sorte kann sich ein Virusbefall innerhalb von vier bis zehn Jahren auf 48 bis 100% der Bäume in der Obstanlage ausweiten, wie JORDOVIC (1968) am Beispiel der Europäischen Pflaume zeigte. Bei der Ausbreitungsgeschwindigkeit spielen die Pflanzenart, die Sorte, der Zeitpunkt der Infektion, die Vektorart, der Infektionsdruck (Vektorpopulation, Vorhandensein geflügelter Stadien) und der Virusstamm eine Rolle (NÉMETH 1986 und 1994). Ein besonders hohes Infektionspotential besteht im Frühjahr und im Herbst, wenn geflügelte Stadien der Blattläuse nacheinander verschiedene Pflanzen aufsuchen (KUNZE und KRCZAL 1971). Je leichter die räumliche Distanz zwischen Infektionsquelle, also dem PPV-infizierten Gehölz, und den gesunden Pflanzen von den Vektoren überwunden werden kann, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion. Dabei spielt nicht nur der absolute Abstand eine Rolle. Einfluss auf die Verbreitungsgeschwindigkeit üben auch die Windrichtung und eventuell vorhandene Barrieren wie Waldstreifen aus. Distanzen von 500m können überwunden werden, wobei infizierte Wildgehölze wie die Schlehe (*Prunus spinosa*), die sich häufig in die Obstanlage säumenden Hecken befinden, als latente Infektionsquelle wirken können (RANKOVIC und DULIC-MARKOVIC 1992, ROY and SMITH 1994). Die Infektion einer Junganlage führt zu größeren Schäden, da bei älteren Bäumen die Virusausbreitung in der Pflanze langsamer verläuft und die Infektion häufig auf einzelne Äste beschränkt bleibt.

1.3.1.7 Virusnachweis

Der Nachweis einer Virusinfektion wird über folgende Verfahren geführt (EPPO 2004):

- 1** biologische Indikatoren (Inokulation durch Veredlung), z. B.
 - Sämlinge des Pfirsichklons GF305,
 - *Prunus tomentosa*;
- 2** serologische Tests, z. B.
 - Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA),

- Double Antibody Sandwich Indirect ELISA (DASI-ELISA),
- Triple Antibody Sandwich (TAS),

3 molekularbiologische Tests, z. B.

- Immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR),
- Cooperational amplification (Co-PCR).

Verfahren 1 basiert auf der visuellen Bonitur der Symptome, die sich auf den Indikatorpflanzen zeigen (s. nachfolgendes Kapitel 1.3.2), Verfahren 2 nutzt die Bindung spezifischer Antikörper an Epitope der Eiweißhülle, Verfahren 3 beruht auf dem Nachweis bestimmter RNA-Abschnitte des viralen Genoms im Pflanzenextrakt.

1.3.1.8 Verteilung des Virus in der Pflanze

Das Scharkavirus wurde in sämtlichen stoffwechselaktiven Geweben der Europäischen Pflaume nachgewiesen, so in der Blattspreite, der Blüte, der Frucht, der Rinde und der Wurzel; allerdings ist das Virus ungleich im Gehölz verteilt, so dass beispielsweise gesunde neben infizierten Trieben, Blättern oder Knospen vorkommen können (ADAMS 1978, KEGLER et al. 1983, ADAMS et al. 1999, EPPO 2004). Dies ist bei der Entnahme von Organteilen zur Überprüfung des Virusstatus, bei Inokulationsversuchen und bei der Vermehrung virusinfizierter bzw. der Gewinnung virusfreier aus virusbefallenen Pflanzen von Bedeutung.

Das Scharkavirus wandert nach der Infektion über das Blattgewebe zumindest bei jungen Bäumen rasch in die Wurzel ein (ADAMS und PATTERSON 1980). Der Virusgehalt unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen und ist vom Genotyp der Wirtspflanze abhängig; eine positive Korrelation zwischen Virustiter und Grad der Anfälligkeit der entsprechenden Pflanze besteht häufig, aber nicht immer (s. S. 20) (KEGLER 1990).

Junge Bäume werden in der Regel sehr rasch systemisch infiziert, während sich die Infektion bei älteren oft auf einzelne Äste beschränkt; dieses Phänomen ist unter dem Begriff „Altersresistenz“ bekannt (HARTMANN 1990).

1.3.2 Symptomausprägung

Der Krankheitskomplex, der sich in den Symptomen manifestiert, die das Scharakavirus an seinen Wirtspflanzen hervorruft, wird als Scharakkrankheit (Pflaumenpockenkrankheit, plum pox disease) bezeichnet. Diese äußerlich sichtbaren Veränderungen nach einer Infektion werden nachfolgend beschrieben.

1.3.2.1 Latenzzeit

Krautige Wirtspflanzen zeigen mitunter bereits zehn Tage nach mechanischer Inokulation typische Blattsymptome. Bei Gehölzen liegt zwischen der Infektion der Pflanze und dem Sichtbarwerden erster Symptome eine Vegetationszeit von drei Wochen bis zehn Monaten (ATANASOFF 1935, NÉMETH 1986). Diese ist, entsprechend den Angaben der Autoren, abhängig

- von der Art der Inokulation, die zur Infektion führt (s. S. 25) (Inokulation durch Veredlung führt als massive Inokulationsmethode bereits nach drei bis vier Wochen zu ersten Symptomen),
- vom Zeitpunkt der Infektion (Infektionen im Herbst führen meist erst im nächsten Jahr zur Symptomausprägung),
- von der Stärke der Infektion,
- vom Virusstamm,
- vom Zustand der infizierten Pflanze (Ernährungszustand, einwirkender biotischer und abiotischer Stress, Alter) und
- vom Genotyp der infizierten Pflanze (Grad der Anfälligkeit, Art der Abwehrreaktion gegen den Virusbefall).

Vereinzelt wurden bedeutend längere Latenzzeiten von bis zu acht Jahren ermittelt.

1.3.2.2 Symptome

Innerhalb der Art *Prunus domestica* L. gibt es Unterschiede im Erscheinungsbild der Scharakkrankheit. Je nach Genotyp, Virusstamm,

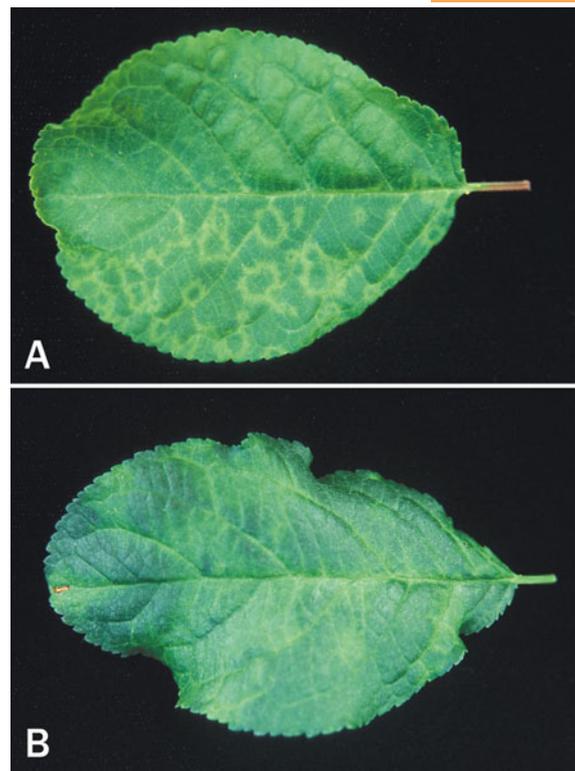


Abb. 1.3–4 PPV-Blattsymptome. **A** Genotyp 'Hoh 5635' ('Elena' × 'Presenta'): scharf abgegrenzte Chlorosen in Form von offenen und geschlossenen Ringen, unregelmäßig auf der Blattspreite verteilt. **B** Sorte 'Elena': unscharf abgegrenzte, hellgrüne, großflächige Muster, Blattspreite leicht gekräuselt.

biotischen und abiotischen Umweltbedingungen (und damit auch je nach Standort) und Jahreszeit können sich einzelne oder mehrere der nachfolgend genannten Krankheitsmerkmale zeigen (ATANASOFF 1935, NÉMETH 1986, EPPO 2004):

- **Blattspreite** (s. Abb. 1.3–4): Symptome treten zuerst an jungen, entfalten Blättern auf, anfänglich mitunter nur als unregelmäßig verteilte Adernaufhellungen oder (seltener) als dunkle, eichenblattförmige Muster entlang primärer und sekundärer Blattadern. Diese Symptome sind meist nur schwer erkennbar. Später werden folgende, deutlicher zu erkennende Merkmale sichtbar: leicht hellgrüne Verfärbungen bis starke Chlorosen in Form von Ringen, Flecken oder Bänderungen unterschiedlicher Größe (wenige Millimeter bis mehrere Zentimeter im Durchmesser), Adernaufhellung oder

Adernvergilbung und Deformationen der Blattspreite. Blattsymptome treten im späten Frühjahr vor dem Eintritt hoher sommerlicher Temperaturen am stärksten hervor, später werden sie häufig maskiert. Bei einigen Sorten bleiben die chlorotischen Ringe oder Flecke ganzjährig sichtbar und werden im Herbst von bräunlichen Rändern gesäumt.

- **Petalen** (nur bei einigen Pfirsichsorten): Verfärbungen, Blattadern treten rötlich hervor.
- **Früchte:** An unreifen Früchten sinkt das Fruchtfleisch an einigen Stellen leicht ein und färbt sich dort vorzeitig blau. Bei einigen Sorten entfallen die Einsenkungen. Mitunter entstehen mit zunehmender Reife tiefe Gräben im Fruchtfleisch, die Ringe, offene Ringe oder unregelmäßige Linien bilden; das Gewebe im darunterliegenden Fruchtfleisch bricht zusammen und verbräunt. Diese Vorgänge führen zur Deformation der vereinzelt klein bleibenden Frucht. Häufig tritt Gummifluss auf. Am Stein zeigen sich mitunter rötliche Ringe oder Flecke. Die Früchte sind geschmacklos und faserig und damit ungenießbar. Viele, teilweise alle Früchte fallen vorzeitig vom Baum. Bei einigen Sorten treten nur leichte, rötliche oder bläuliche Marmorierungen auf der Epidermis der Frucht auf, die erst deutlich sichtbar werden, wenn die Beduftung entfernt wird. Die Reife ist um mehrere Tage verfrüht. Stark geschädigte Früchte sind weder zum Frischverzehr noch zur Verarbeitung, noch für Brennzwecke geeignet.

Der Name Pflaumenpockenkrankheit (übersetzt für das Bulgarische „*Scharka*“) leitet sich von den strukturellen Veränderungen der Fruchtoberfläche (Einsenkungen, Verfurchungen) her. Der Verfasser hält die Bezeichnung „Pocken“ für die Symptome für nicht korrekt, da im Deutschen damit Ausbuchtungen oder Erhebungen aus einer regelmäßig geformten

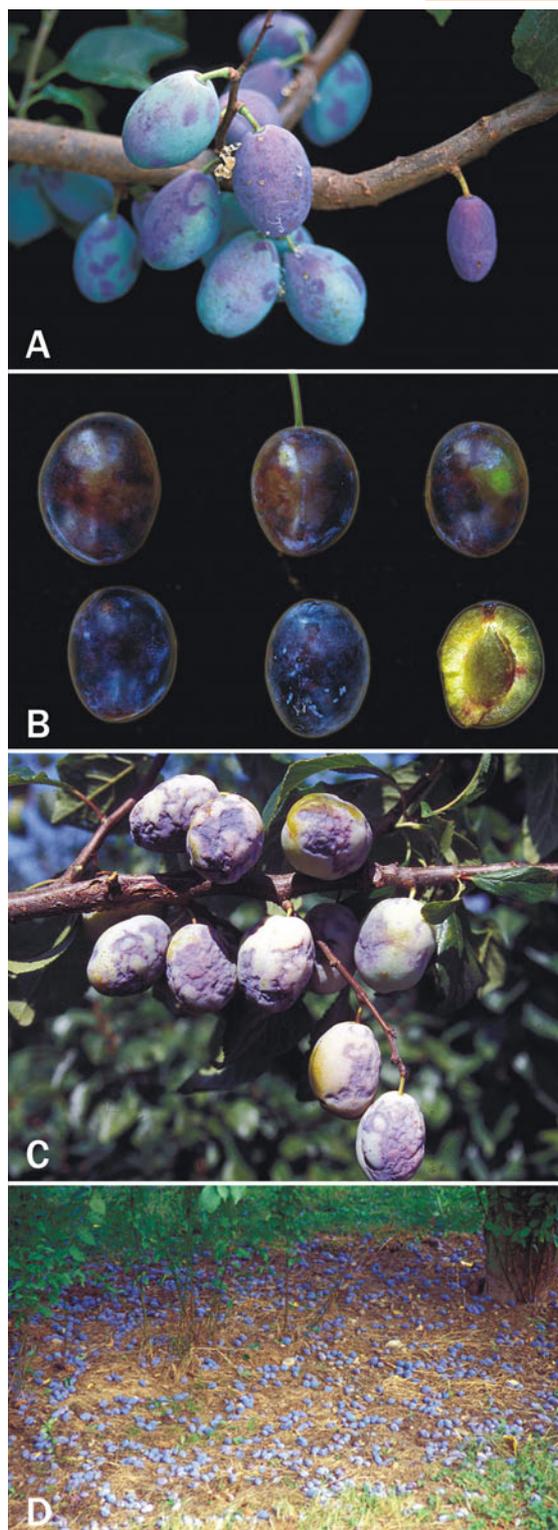


Abb. 1.3–5 PPV-Fruchtsymptome: **A** Marmorierungen der Frucht vor der Reife, Gummifluss. **B** Marmorierungen und leichte Einsenkungen auf der Frucht; Verfärbungen im Fruchtfleisch. **C** Tiefe Verfurchungen. **D** Vorerntefruchtfall. (Aufnahmen B, C und D: HARTMANN).

Fläche bezeichnet werden, nicht jedoch Einsenkungen. Auch ATANASOFF (1935) hält die von ihm selbst 1933 eingeführte Terminologie „*Plum pox disease*“ für verbesserungswürdig und schlägt stattdessen den Namen „*Mosaik of stone fruits*“ vor, da scharkabedingte Verfurchungen der Fruchtoberfläche nicht bei allen Genotypen der Europäischen Pflaume und beim Pfirsich überhaupt nicht vorkommen. Diese Bezeichnung konnte sich aber nicht durchsetzen.

- **einjähriges Holz:** Hier kommt es zu rostbraunen Verkorkungen mit nachfolgendem Aufreißen des primären Abschlussgewebes. Die Triebe werden brüchig, die Bruchstellen sind ungewöhnlich glatt. Der Anteil des Phloems im einjährigen Spross nimmt deutlich zu, der Anteil lignifizierten Xylems sinkt (BUCHTER et al. 1987).
- **mehnjähriges Holz:** Bei einigen Sorten (z. B. 'Green Gage' = 'Große Grüne Reneklode', 'Italienische Zwetsche' = 'Fellenberg', 'Dabrovice', 'Ortenauer' und 'Kirkespflaume'), reißt auch das zweijährige Holz auf, die Zweige flachen ab und entwickeln mitunter offene, krebstartige Stellen. Bei bestimmten Sorten sterben einzelne Zweige von der Terminale her ab (ZAWADZKA 1980), mitunter auch ganze Bäume (z. B. bei den Sorten 'Fellenberg' und 'Große Grüne Reneklode'); die Mortalitätsrate ist generell erhöht (SZIRMAI 1961).
- **Wurzelsystem:** Das Wurzelwachstum ist vermindert, und die Verzweigungsdichte der Wurzeln ist sehr hoch.
- **vegetatives Wachstum:** Dieses ist geringfügig bis stark reduziert (HAMDORF und HEIN 1989).

Bei vielen Sorten treten Frucht- und Blattsymptome gemeinsam auf, andere wiederum zeigen hauptsächlich nur Frucht- oder nur

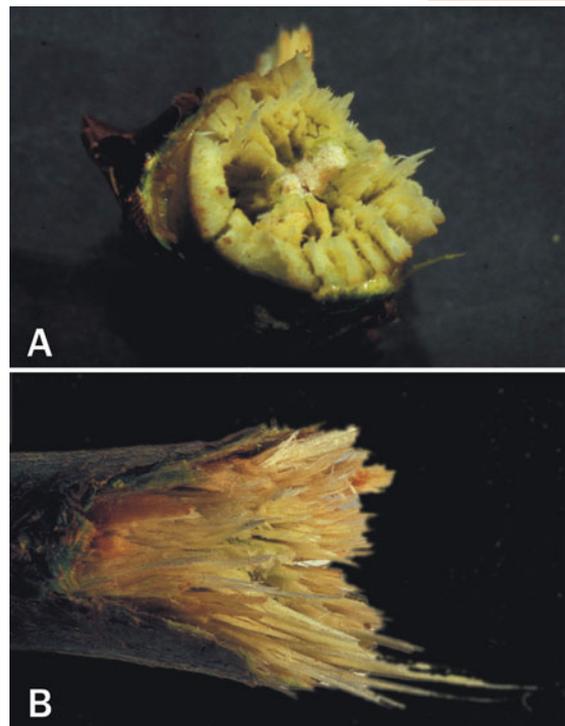


Abb. 1.3-6 Auswirkungen der Scharkavirose auf einjährige Triebe (Bruchtest). **A** PPV-infizierter einjähriger Trieb: sehr glatte Bruchstelle. **B** Einjähriger Trieb eines gesunden Baumes: Bruchstelle faserig aus. (Aufnahmen: HARTMANN)

Blattsymptome (ZAWADZKA 1980, FISCHER et al. 2002). Insbesondere für die Ausbildung der Fruchtsymptome hat der Wasserhaushalt im Sommer entscheidenden Einfluss; feuchte Witterung verringert den Anteil geschädigter Früchte, während Trockenstress die Ausprägung von Fruchtschäden entscheidend begünstigt (ebda., HARTMANN und PETRUSCHKE 2000). Andere Umweltfaktoren wie ein unausgeglichenes Nährionenangebot und die Belastung mit industriellen Immissionen verstärken die Symptomausprägung (VANEK et al. 1992).

1.3.3 Wirtschaftliche Schäden durch PPV

Die Scharkkrankheit gilt als die bedeutendste Virose laubabwerfender Obstgehölze (NÉMETH 1986). Sie verursacht auf betriebs- und volkswirtschaftlicher Ebene beträchtlichen Schaden. Bereits ATANASOFF (1935) erkannte das Schadpotenzial des Virus.

1.3.3.1 Auswirkungen von Scharkabefall auf die Wirtschaftlichkeit der Obstanlage

Die Wirtschaftlichkeit einer Obstanlage hängt neben den Investitionskosten und dem Vermarktungspreis für die erzeugte Ware vor allem davon ab, wie hoch der Flächenertrag an vermarktungsfähigen Früchten und der erforderliche Arbeitsaufwand pro Flächeneinheit sind.

Eine Infektion mit dem Scharkavirus zieht folgende Konsequenzen nach sich:

- 1 Die Blattnettophotosyntheserate scharkakranker Bäume ist in Blättern mit Scharkasymptomen um bis zu 40% reduziert, wie ZHANG et al. (2000) für Pfirsich und Aprikose zeigten. Dies kann zwei Ursachen haben: Zum einen nimmt die Menge photosynthetisch aktiver Pigmente pro Blattflächeneinheit mit zunehmender Ausprägung der Blattsymptome (Chlorosen) ab, zum anderen stehen dem Baum durch die virusbedingte Umstellung des zellulären Stoffwechsels (Virusreplikation, Virusausbreitung, Einleitung von Abwehrmechanismen) weniger Kohlenhy-

drate für das eigene Wachstum zur Verfügung.

- 2 Infolgedessen nehmen die Wuchsleistung des Baumes und die äußere wie innere Qualität der Früchte ab. Die Zunahme des Stammdurchmessers als Maß für die vegetative Leistung war bei scharkakranken Bäumen um bis zu 38% reduziert (NÉMETH 1994). JORDOVIC und JANDA (in NÉMETH 1994) berichten von einer Abnahme der Einzelfruchtmasse nach Scharkabefall um 21 bis 34% und von einer Reduktion des Zuckergehaltes um bis zu 2,1 Prozentpunkte bei einem gleichzeitigen leichten Anstieg des Gehaltes an organischen Säuren um 0,14 Prozentpunkte. ZAWADZKA (1965) und PIELKA et al. (1971) kommen zu ähnlichen Ergebnissen. In Bulgarien wurde bei sehr anfälligen Lokalsorten ein Vorerntefruchtfall von 95 bis 100% beobachtet. Auch bei der in Deutschland meistverbreiteten Sorte 'Hauszwetsche' kann dies der Fall sein (NÉMETH 1986).

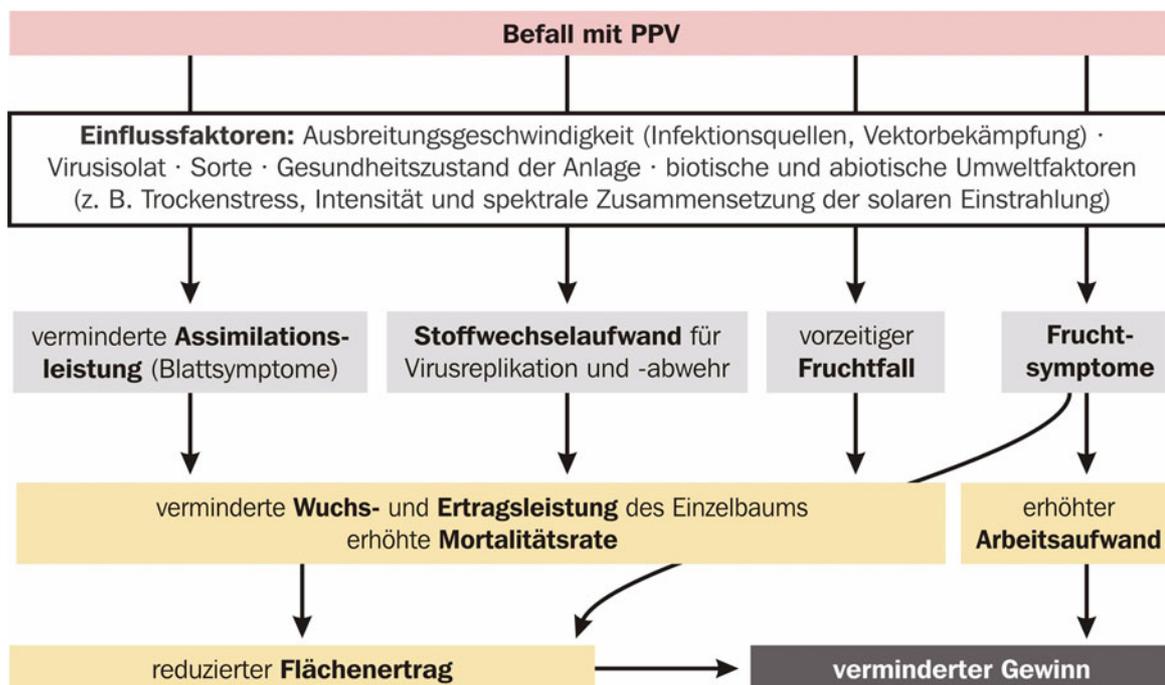


Abb. 1.3-7 Auswirkungen von Scharkabefall auf wichtige Parameter einer Steinobstanlage. Einige wichtige Einflussfaktoren sind angegeben.

- 3 Durch die Verfurchungen und starken Verfärbungen sind die meisten der am Baum verbleibenden Früchte empfindlicher Sorten nicht mehr vermarktungsfähig. Das Aussortieren symptomtragender Früchte erfordert einen hohen Arbeitsaufwand.
- 4 Durch die sinkende Vitalität der Bäume nimmt die Zahl der Baumausfälle zu. Damit sinkt die Flächenproduktivität.
- 5 Die Ausbreitungsgeschwindigkeit in der Anlage ist sehr hoch; innerhalb weniger Jahre können sämtliche Bäume befallen sein (s. Kapitel 1.3.1.6 „Übertragung und Verbreitung“ auf S. 8).
- 6 Bei Mischinfektionen mit anderen Viren (z. B. *Prune dwarf virus* (PDV) und *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)) verstärkt sich die Symptomausprägung, die Mortalitätsrate der Bäume steigt (NÉMETH 1994).

In Abb. 1.3–7 sind die Auswirkungen von Scharkabefall auf eine Obstanlage zusammenfassend dargestellt. Befallene Anlagen können kaum gewinnbringend geführt werden.

1.3.3.2 Geographische Verbreitung der Scharkakrankheit

Ausgehend von Bulgarien verbreitete sich das Scharkavirus zwischen 1920 und 1950 über gesamt Südosteuropa.

In Deutschland wurde sie erstmals 1956 in der Nähe von Worms gefunden. Von dort aus verbreitete sie sich wahrscheinlich über infizierte Wurzeläusläufer, die zur versuchsweisen Vermehrung verwendet wurden, in Baumschulen, griff dort auf die Unterlage 'Brompton' über und wurde mit ihr, da sie kaum Blattsymptome zeigt, zwischen 1950 und 1970 in die Hauptanbaugebiete der Zwetsche verschleppt (SCHUCH 1957, KUNZE 1981). Die Rodung infizierter Bäume setzte vielerorts zu spät und schleppend ein. Oft wurden die Scharkasymptome auch nicht erkannt.

Mittlerweile ist die Krankheit in ganz Europa verbreitet, auch in Skandinavien ist sie vertreten (EPPO 2003, BLYSTAD et al. 2004). Seit

2004 ist in mehreren Kantonen der Schweiz, die trotz älterer Berichte über das Auftreten der Krankheit bislang als befallsfrei eingestuft wurde, Scharkabefall zu vermelden (HÖHN et al. 2005). In den zurückliegenden Jahren griff die Krankheit auf andere Kontinente über: Sie ist in Süd- (Chile) und Nordamerika (Kanada, USA [Pennsylvania]), Asien (Türkei, Russland, Georgien, Aserbaidschan, Indien) und Afrika (Ägypten) nachgewiesen (EPPO 2003) (s. Abb. 1.3–8). In jüngster Zeit wurde zudem PPV-Befall in China bestätigt (NAVRATIL und SAFAROVA 2005).

Heute tritt die Virose in Deutschland in allen Hauptanbaugebieten der Europäischen Pflaume auf (ROY und SMITH 1994, HARTMANN 1994). Insbesondere in den Produktionszentren entlang des Rheins (Breisgau, Ortenau, Pfalz, Rheinhessen) und des Mains (Unterfranken (RIEHL 2005)), die den Hauptanteil der deutschen Produktion erzeugen, ist die Verbreitung flächendeckend. Dort entstehen aufgrund der trockenen-warmen Sommerwitterung auch die höchsten Schäden. Im Norden Deutschlands mit kühleren und feuchteren Sommern sind die Auswirkungen der Scharkakrankheit geringer. Im Umland von Berlin und Dresden konnte ebenfalls eine weite Verbreitung des Scharkavirus gezeigt werden (FISCHER et al. 2002, REBENSTORF und BÜTTNER 2004). Sowohl PPV-M, PPV-D als auch PPV-Rec wurden in Deutschland nachgewiesen (KRCZAL und AVENARIUS 1994, JARAUSCH et al. 2004, GLASA et al. 2004).

Viele Länder versuchen, die Ausbreitung des Scharkavirus durch Rodungsmaßnahmen zu verhindern (NÉMETH 1986, ROY und SMITH 1994). So wurde beispielsweise in Frankreich im Jahr 1992 nach dem lokalen Ausbruch einer Scharkaepidemie allein in einer Anbauregion eine Fläche von 500ha Pfirsichen gerodet, nachdem bereits im Vorjahr 27000 Bäume vernichtet worden waren. In Spanien wurden zwischen 1988 und 1993 560000 Aprikosen- und Pflaumenbäume gerodet, wodurch Kosten von drei Millionen Euro entstanden. Allein in der Region Valencia entstand in dieser Zeit durch die niedrigere Produktivität ein Schaden von 18 Millionen Euro. In Bulgarien verursachte die Krankheit bis in die 1980er Jahre jährliche Verluste von 60000t Pflau-

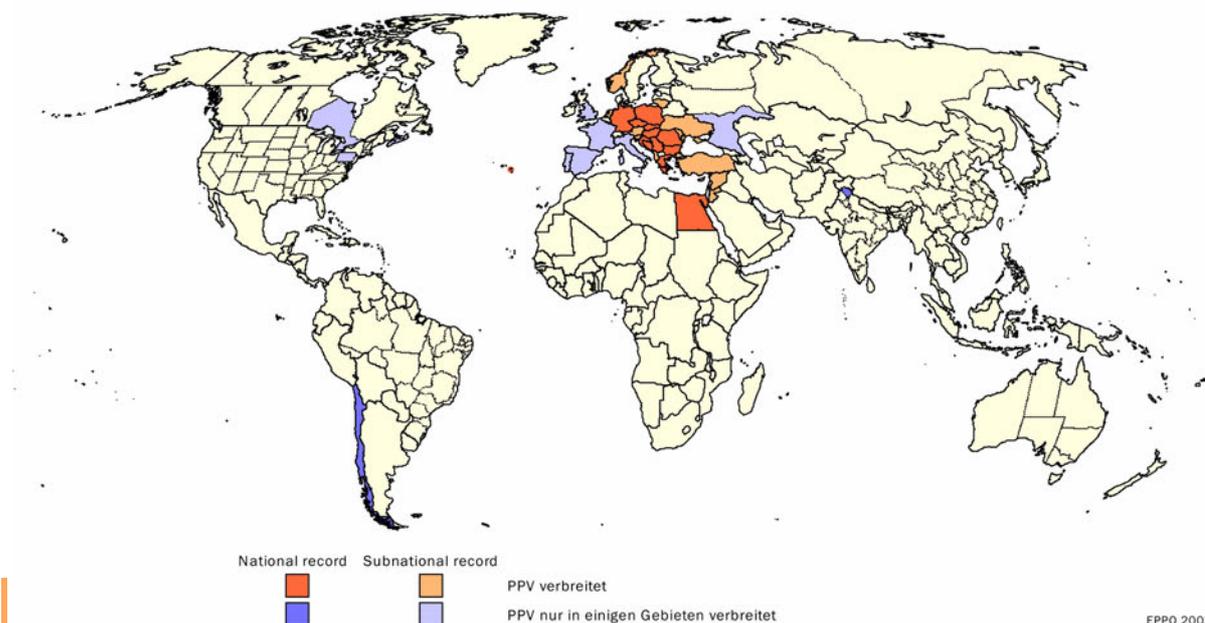


Abb. 1.3-8 Weltweite Verbreitung des Scharkavirus (*Cartes de répartition géographique des organismes de quarantaine pour l'Europe: Plum pox virus*) (aus EPPO 2003)

menfrischware. Die Anbaufläche der Europäischen Pflaume in diesem Land sank scharkabedingt von 32700ha Anfang der 1970er Jahre auf 17700ha Ende der 1980er Jahre, die Produktion ging von 249000t auf 124000t zurück (DJOUVINOV und VITANOVA 2000). Bedingt durch eine Infektionsrate von 58% aller Bäume der Europäischen Pflaume lag in den Ländern des ehemaligen jugoslawischen Bundesstaates der Durchschnittsertrag pro Baum im Jahr 1993 bei nur 8kg (RANKOVIC et al. 1995). Quarantänemaßnahmen wie die Rodung sind ein wirksames Instrument, um die Ausbreitung der Scharkakrankheit in bislang befallsfreie Gebiete zu verzögern. In Befallszentren ist eine Ausrottung des Scharkavirus nicht mehr möglich. Hauptursache für die großräumige Verbreitung ist der gebietsübergreifende Handel mit Pflanzmaterial, wodurch virusbefallene Edelreiser, Unterlagen oder Bäume in bislang befallsfreie Gebiete gelangen (NÉMETH 1986 und 1994, ROY und SMITH 1994).

Das Ausmaß der Verbreitung, die aus epidemiologischer Sicht als hoch einzuschätzende Verbreitungsgeschwindigkeit und die Schäden, die sie hervorruft, machen sie Scharkakrankheit zur bedeutendsten Virose des Steinobstes weltweit (NÉMETH 1986).

1.3.3.3 Bekämpfung der Scharkavirose

Aus den vorstehend gegebenen Erläuterungen über die Scharkakrankheit sind Ansatzpunkte für eine Bekämpfung der Virose ersichtlich. Viele der nachfolgend zusammengetragenen Elemente einer erfolgversprechenden Bekämpfungsstrategie wurden bereits von ATANASOFF (1933) erkannt. Da eine Gesundung erkrankter Pflanzen nicht möglich ist, konzentrieren sich die zu treffenden Maßnahmen auf die Verhinderung von Infektionen und die Minimierung wirtschaftlicher Schäden nach Infektionen (KUNZE 1981 und 1986, NÉMETH 1986 und HARTMANN 1990):

- Blattläuse als Vektoren der Scharkavirose müssen bereits bei schwachem Befall frühzeitig bekämpft werden. Dabei ist besonderes Augenmerk auf die Hauptbefallszeiträume im Frühjahr und Spätsommer/Herbst zu richten.
- Die Baumbestände und benachbarte Wirtspflanzen sind regelmäßig auf Symptome der Scharkavirose zu kontrollieren, befallene Gehölze sind unverzüglich zu roden; Neuaustriebe aus dem Wurzel-

stock und die Bildung von Wurzelschossern sind zu unterbinden. In Gebieten mit sehr starkem Befall ist eine Rodung nur in den ersten Standjahren der Anlage sinnvoll.

- Für Neuanpflanzungen sind virusfreie Pflanzen zu verwenden. Dies setzt die Verwendung scharkavirusfreier Edelreiser und Unterlagen und eine angemessene Kulturführung in der Baumschule voraus.
- Bei der Erstellung von Anlagen in Befallsgebieten sind ausreichende Abstände zu infizierten Beständen einzuhalten, so dass die Ausbreitung von Vektoren von befallenen Pflanzen in die zu schützende Anlage sehr unwahrscheinlich ist.
- Um die wirtschaftlichen Schäden von Infektionen zu minimieren, die trotz der

genannten Vorsichtsmaßnahmen auftreten, sind scharkatolerante Sorten zu verwenden. Stresseinwirkungen auf die Pflanzen sind zu minimieren; je besser die Nährionen- und Wasserversorgung den Bedürfnissen der Pflanzen angepasst ist, desto schwächer prägen sich die Symptome der Krankheit aus. Entsprechendes gilt für die Kontrolle der anderen abiotischen und für die biotischen Umweltfaktoren.

- Der Anbau hypersensibler Genotypen, die in der Lage sind, eingedrungene Scharkaviren zu isolieren, ermöglicht die wirtschaftliche Produktion in Scharkabefallsgebieten und verhindert die Ausbreitung der Virose über latent infiziertes Vermehrungs- und Pflanzmaterial.

1.4 Bisherige Bemühungen zur Züchtung scharkaresistenter Sorten

Der Begriff Scharkaresistenz ist in den zurückliegenden Jahrzehnten von verschiedenen Autoren äußerst unterschiedlich gebraucht worden. Entsprechend widersprüchlich sind Aussagen zum Resistenzgrad einzelner Sorten.

Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die Scharkavirose zum Gegenstand intensiver Forschung. Das Wissen über pflanzliche Resistenzmechanismen hat sich seitdem vervielfacht. Es hat jedoch bis in neuere Zeit nicht oder nur teilweise Eingang in die züchterische Bewältigung der Scharkaproblematik gefunden. Deshalb ist es an dieser Stelle notwendig, die in den vergangenen Jahrzehnten hinzugewonnenen Erkenntnisse über die pflanzliche Virusabwehr mit den Ergebnissen der Scharkaresistenzzüchtung synoptisch zu verbinden.

Die Aspekte, die das Virus betreffen, sind im vorangegangenen Unterkapitel dargestellt. Nachfolgend sollen der Begriff „Resistenz“ definiert und Vorstellungen über Resistenzmechanismen vorgestellt werden. Dabei wird stets Bezug auf die Situation bei der Interaktion PPV/*Prunus domestica* genommen. Besonders wichtig erscheint es in diesem Zusammenhang, Methoden für die Prüfung von Resistenzeigenschaften detailliert darzulegen. Dies ist die Voraussetzung dafür, die in der Literatur dargestellten Ergebnisse zu interpretieren und für die Züchtung nutzbar zu machen. Auf dieser Basis werden im weiteren Verlauf die bisherigen Bemühungen der Scharkaresistenzzüchtung beurteilt.

Die nachfolgenden Überlegungen schaffen die Grundlage dafür, die Bedeutung der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus darzulegen und einzuschätzen. Der Hypersensibilität ist ab S. 32 ein eigenes Unterkapitel gewidmet.

1.4.1 Zur Bedeutung des Begriffs „Resistenz“

Die Verwendung des Begriffes „Resistenz“ gegen Phytopathogene ist in der Literatur uneinheitlich. Dies rührt nach Auffassung von

COOPER und JONES (1983) daher, dass Phytopathologen und Pflanzenzüchter pflanzliche Erkrankungen von verschiedenen Blickwinkeln aus betrachten: Bei Ersteren steht das Phytopathogen im Mittelpunkt des Interesses, bei Letztgenannten die Pflanze mit den als schädigend eingestuft Symptomen, die als Reaktion auf den Pathogenbefall entstehen. Zudem können sich je nachdem, ob das Pathogen extra- oder intrazellulär die Pflanze befällt, Unterschiede im Sprachgebrauch zu der Beschreibung der Wirt-Pathogen-Interaktion ergeben.

COOPER und JONES (1983) schlagen eine weithin akzeptierte Definition des Resistenzbegriffs vor. Nachfolgend soll dieses System der Terminologie erläutert und ergänzt werden:

- 1 Zunächst wird die Antwort der Pflanze auf das Zusammentreffen mit dem Pathogen (im vorliegendem Fall dem Virus) betrachtet. Es gibt nur zwei Möglichkeiten: Entweder kann die Pflanze infiziert werden oder nicht. Unter Infektion ist nach FRÖHLICH (1991) der „Kontakt und das Eindringen von Parasiten oder Pathogenen [...] in einen Wirt und [die] Errichtung eines stabilen, permanenten oder temporären parasitischen Verhältnisses“ zu verstehen. Im Fall der Inokulation mit Viren bedeutet sie nach COOPER und JONES in Übereinstimmung mit der von FRÖHLICH gegebenen Definition, dass Viren in eine Zelle eintreten, in der ihre Nucleinsäure nachfolgend repliziert wird. In diesem Fall ist die Pflanze infizierbar (engl.: *infectible*), ansonsten immun (engl.: *immune*). Bei Immunität kommt es also zu keiner wesentlichen Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze, die damit als Nicht-Wirt bezeichnet werden kann. Eine Pflanze ist immun gegen die meisten der existierenden pflanzlichen Schaderreger, nur wenige sind in der Lage, sie zu infizieren (KLUGE 1995). Das bedeutet auch, dass es seitens der Pflanze keines besonderen Stoffwechselaufwandes zur Abwehr des Pathogens

nach der Inokulation bedarf, wenn Immunität vorliegt.

Wesentlich ist, dass das bei einer Infektion aufgebaute parasitische Verhältnis auch nur temporär sein kann. Damit gilt eine Pflanze als infizierbar auch dann, wenn der inokulierte Schaderreger in ihr seinen Reproduktionszyklus nicht vollständig abschließen kann oder die Ausbreitung in benachbarte Zellen nicht möglich ist und die inokulierte Zelle abstirbt.

- 2** Ist eine Pflanze infizierbar, so kann sich das Pathogen in ihr vermehren. Dabei treten jedoch in Abhängigkeit vom Genotyp der Wirtspflanze deutliche Unterschiede auf: In manchen Genotypen kann es sich auf große Gewebebereiche ausbreiten, sich dort in hoher Individuendichte ansiedeln und stark vermehren. Diese Genotypen sind als anfällig (engl.: *susceptible*) zu bezeichnen. Im Gegensatz dazu gibt es Genotypen der gleichen Art, die die „Entwicklung eines bestimmten Pathogens behindern“ und als resistent (gleichlautend im Englischen) bezeichnet werden. Diese Definition der FEDERATION OF BRITISH PLANT PATHOLOGISTS aus dem Jahr 1973 legt eindeutig fest, dass als Unterscheidungskriterium zwischen anfällig und resistent das Verhalten des Pathogens im Wirt und nicht die Ausprägung des Krankheitsbildes, wie dies die BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY im Jahr 1950 noch vorschlug, herangezogen wird.

In resistenten Pflanzen ist demnach

- (a) entweder die Vermehrung des Pathogens in der Pflanze stark vermindert
- (b) oder dessen Ausbreitung innerhalb der Pflanze beschränkt,
- (c) oder es liegt eine Kombination der unter (a) und (b) genannten Möglichkeiten vor.

Anfälligkeit und Resistenz sind die Anfangs- und Endpunkte einer Skala, mit der das Verhalten des Pathogens in der

Pflanze beschrieben wird. Es gibt also Übergangsformen, die die Grenzziehung nicht immer leicht machen.

Hinsichtlich detaillierterer Informationen zu Ausprägungsformen der Resistenz sei auf Kapitel 1.4.2 „Formen der Virusresistenz“ auf S. 20 verwiesen.

- 3** Das typische Symptom oder Syndrom, das ein Pathogen hervorruft, ist Ausdruck der Antwort der Pflanze auf den Pathogenbefall. Genotypen, die typische Symptome ausprägen, sind als empfindlich oder sensibel (engl.: *sensitive*), solche, die nur schwache oder – trotz Befalls mit dem Pathogen – keine Symptome ausbilden, als tolerant (gleichlautend im Englischen) zu bezeichnen. Tolerante Genotypen zeigen also kaum einen oder keinen sichtbaren Effekt auf die Infektion mit dem Pathogen. Dies kann Folge einer Resistenz sein; dennoch gibt es beispielsweise bei der Europäischen Pflaume Sorten, die einen hohen Scharkavirusgehalt aufweisen und demnach anfällig sind, aber kaum Symptome ausprägen. Umgekehrt sind Sorten bekannt, die bei geringem Virusgehalt starke Scharkasymptome zeigen (KEGLER 1990). Dies verdeutlicht, dass eine Unterscheidung zwischen dem Verhalten des Virus in der Pflanze nach der Infektion und dem Verhalten der Pflanze auf den Pathogenbefall zur wissenschaftlichen Beschreibung der pflanzlichen Pathogenabwehr unabdingbar ist.

Wie beim Begriffspaar „anfällig – resistent“ bezeichnen auch die Begriffe „empfindlich/sensibel“ und „tolerant“ zwei extreme Ausprägungsformen mit fließenden Übergängen. Welche Genotypen unter bestimmten Umweltbedingungen als sensibel und welche als tolerant einzustufen sind, hängt ab

- (a) vom betrachteten Symptom und
- (b) von der Beurteilung der Symptomausprägungen.

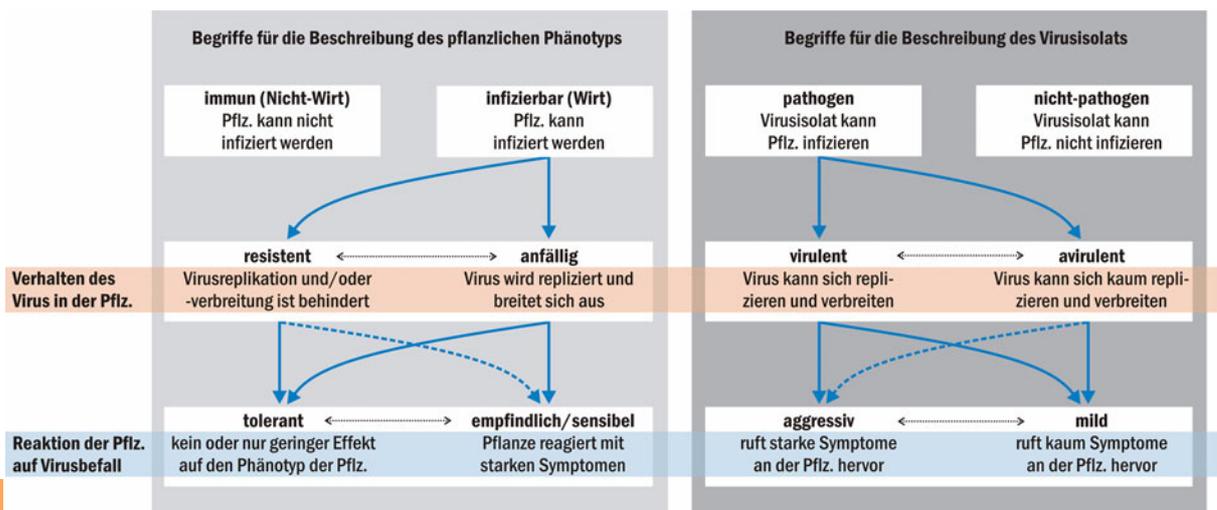


Abb. 1.4–1 Begriffe zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen Pflanzen und phytopathogenen Viren (nach COOPER und JONES 1983 und FRASER 1985a, verändert).

Aus obstbaulicher Sicht interessieren in Bezug auf die Scharkakrankheit primär die Fruchtsymptome. Deren Stärke ist aber nicht zwangsläufig mit der Intensität der Blattsymptome korreliert: Die Sorten 'Königin des Balkans' und 'Stanley' beispielsweise zeigen bei PPV-Befall keine Schäden an der Frucht, wohl aber Symptome am Blatt bei gleichzeitig hohem Virustiter (BIVOL et al. 1988, KEGLER 1990). Sie sind also aus obstbaulicher Sicht als tolerant einzustufen. (Keineswegs aber sind sie resistent, da der Virusgehalt in der Blattspreite ähnlich hoch ist wie in anfälligen Sorten.) Werden die Blattsymptome zum Maßstab genommen, ist 'Stanley' als schwach empfindlich zu bezeichnen.

Auch die Stärke der ausgeprägten Symptome spielt eine Rolle. Können schwache Verfärbungen auf den Früchten als PPV-Symptome akzeptiert werden, so sind Verfärbungen auf der Fruchtoberfläche aus obstbaulicher Sicht nicht mehr hinnehmbar; eine derartig reagierende Sorte ist als empfindlich einzustufen.

Da die Beschreibung der Reaktion der Pflanze auf den Virusbefall – wie soeben aufgezeigt – vom betrachteten Symptom abhängt, schlägt der Verfasser die Ver-

wendung der Bezeichnungen „frucht tolerant“ und „blatt tolerant“ vor. Damit ist eine eindeutige Charakterisierung eines Genotyps hinsichtlich seiner Reaktion auf den Befall mit – im vorliegenden Fall – PPV möglich. Antonyme sind die Begriffe „fruchtempfindlich/fruchtsensibel“ bzw. „blattempfindlich/blattsensibel“. Beispiele für fruchttolerante, blattsensible Sorten der Europäischen Pflaume sind 'Stanley' und 'Katinka', wobei letztere deutlich stärkere Blattsymptome zeigt als die erstgenannte Sorte. KEGLER et al. (1993) schlagen zudem den Begriff „Leistungstoleranz“ als landwirtschaftlich wichtige Kenngröße vor. Darunter ist die Fähigkeit einer Pflanze zu verstehen, in der Ertragsleistung trotz Pathogenbefalls nur geringfügig nachzulassen.

In der Virologie finden die genannten Definitionen für die Beschreibung von Resistenzerscheinungen sicherlich die besten Entsprechungen; beispielsweise ist hier die Symptomausprägung in vielen Fällen tatsächlich unabhängig von der Höhe des Virusgehalts (FRASER 1985a). Bei Wirt-Parasit-Beziehungen zwischen Pflanzen und Pilzen ist das Schadbild dagegen zumeist strenger mit der Dichte der Besiedelung mit dem Pathogen korreliert, so dass die Vermischung der Ebenen Anfälligkeit/Resistenz und Empfind-

lichkeit/Toleranz im Sprachgebrauch nachvollzogen, aber nicht akzeptiert werden kann. Treffend kann Resistenz mit Widerstandskraft der Pflanze gegenüber dem Virus, Toleranz mit Virusverträglichkeit der Pflanze umschrieben werden (KUNZE 1986).

Dass Resistenzgrad, gemessen an der Viruskonzentration in der Pflanze, und Toleranzgrad, gemessen an der Stärke der Symptomausprägung, nicht korreliert sein müssen, zeigen Beispiele bei der Europäischen Pflaume: Manche Sorten wie 'President' und 'Ruth Gerstetter' zeigen kaum Blatt- und Fruchtsymptome, weisen aber hohe Scharkaviruskonzentrationen auf (KEGLER 1990). Sie sind also als anfällig und zugleich tolerant zu bezeichnen. Sie setzen dem Virus wenig Widerstand entgegen, da seine Replikation und Ausbreitung nicht behindert wird, sind aber zugleich virusverträglich. Andererseits gibt es Sorten wie 'Kirke', in denen die Scharkaviruskonzentration niedrig bleibt, die aber deutliche Blattsymptome ausprägen (ebda.); sie sind also resistent, aber empfindlich.

Die Schädwirkungen eines Pathogens auf eine bestimmte Pflanzenart hängen unter gegebenen Umweltbedingungen nicht nur von deren Resistenzverhalten, sondern in entscheidendem Maße auch vom Pathogenstamm ab, von dem die Pflanze befallen wird (s. Kapitel 1.3.1.4 „Virusstämme“ auf S. 6). Deshalb ist es notwendig, auch die Eigenschaften eines bestimmten Pathogens zu beschreiben. Dabei sind wiederum klar definierte Begrifflichkeiten notwendig (nach FRASER 1985a):

- 1 Zunächst wird die Fähigkeit des Pathogens betrachtet, einen Wirt zu infizieren. Ist dies möglich, ist der Schaderreger bzw. der -stamm ein Pathogen (gleichlautend im Englischen), ansonsten ein Nichtpathogen (engl. *non-pathogen*).
- 2 Ist der Pathogenstamm in der Lage, sich im Wirt ungehindert zu reproduzieren und zu verbreiten, ist er als virulent, ist die Reproduktion und/oder Verbreitung behindert, als avirulent (jeweils gleichlautend im Englischen) zu bezeichnen.

- 3 Ruft ein Pathogenstamm starke Symptome an der Wirtspflanze hervor, nennt man ihn aggressiv (engl. *aggressive*), ansonsten mild (gleichlautend im Englischen).

Wie ersichtlich ist, werden zur Beschreibung des Pathogens die gleichen messbaren Kriterien wie zur Beschreibung der Pflanze in Bezug auf den Pathogenbefall zu Grunde gelegt, nämlich das Verhalten des Virus in der Pflanze und das Verhalten derselben auf den Virusbefall. Ähnlich wie bei der Unterscheidung zwischen Resistenz und Toleranz ist auch die Abgrenzung von Virulenz zu Aggressivität nur aufgrund der an der Pflanze beobachtbaren und messbaren Parameter „Pathogenreproduktion und -vermehrung“ und „Symptomausprägung“ möglich. Auch hier besteht in vielen Wirt-Parasit-Interaktionen eine positive Korrelation, die als solche jedoch nicht vorausgesetzt werden kann.

Beim Scharkavirus beispielsweise ist PPV-M als virulenter als PPV-D einzustufen, da sich erstgenannter Stamm zumeist schneller verbreitet (s. Kapitel 1.3.1.4 „Virusstämme“ auf S. 6).

In Abb. 1.4–1 auf S. 19 sind die Begriffe, die zur Charakterisierung von pflanzlichen Genotypen und Isolaten phytopathogener Viren erforderlich sind, in einer Übersicht dargestellt.

1.4.2 Formen der Virusresistenz

Während des gesamten Reproduktions- und Verbreitungszyklus eines Virus in der Pflanze können seitens des Wirtes Mechanismen wirksam werden, die diesen Zyklus stören oder unterbinden. Nachfolgend soll ein kurzer Aufriss über die möglichen Ansatzpunkte pflanzlicher Virusresistenz gegeben werden (FRASER 1990) (s. Abb. 1.4–2):

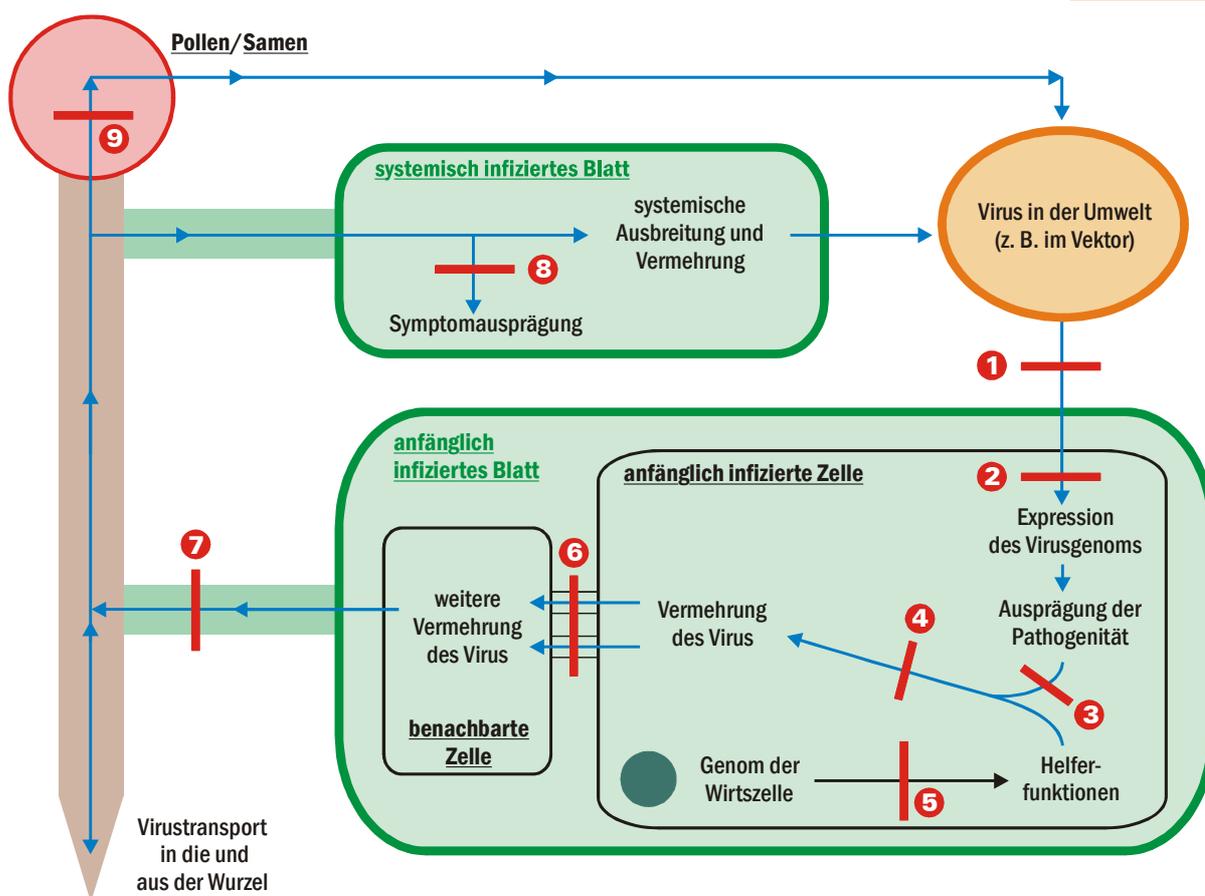


Abb. 1.4–2 Ansatzpunkte pflanzlicher Resistenzmechanismen im schematisch dargestellten Zyklus viraler Infektion und Multiplikation. **1** · Vektorresistenz. **2** · Behinderung der Expression und Replikation des viralen Genoms. **3+4** · Resistenz durch pflanzliche Inhibitoren. **5** · Resistenz als „Fehlen von Anfälligkeit“ (für die virale Multiplikation notwendige pflanzliche Genprodukte werden nicht zur Verfügung gestellt). **6** · Behinderung der Ausbreitung von Zelle zu Zelle. **7** · Behinderung der systemischen Ausbreitung des Virus in der Pflanze. **8** · Behinderung der Symptomausprägung („Toleranz“). **9** · Behinderung der Ausbreitung des Virus über Pollen oder Samen. (nach FRASER 1990, mit freundlicher Genehmigung von Springer Science und Business Media)

- **Resistenz gegenüber der Virusübertragung**

Diese liegt beispielsweise vor, wenn die Pflanze nicht von den natürlichen Vektoren des Virus befallen wird. Sie ist dann zwar prinzipiell Wirtspflanze, wird aber nur nach künstlicher Inokulation erkranken. Bereits ATANASOFF (1935) berichtet davon, dass Aprikosen in Bulgarien scharkafrei bleiben, weil sie vom Hauptvektor der Virose nicht befallen werden. In der Regel reicht Vektorresistenz aber nicht aus, um Befall mit PPV zu verhindern. Bei der Europäischen Pflaume ist Vektorresistenz einzelner Genotypen –

anders als beim Pfirsich (DOSBA et al. 1987) – nicht nachgewiesen (RÜHL 1994).

- **Resistenz durch Behinderung der Expression und/oder Replikation des viralen Genoms**

Für die Expression und Replikation seines Genoms ist das Virus auf Stoffwechselprodukte wie Nucleotidtriphosphate, Aminosäuren und Proteine sowie Zellorganellen (z. B. Ribosomen) der Pflanze angewiesen. Gibt es seitens der Pflanze einen Mechanismus, der die Nutzung einer dieser Komponenten durch das Virus verhindert, ist der Replikationszyklus unterbrochen.

- **Resistenz durch Inhibitoren**

Resistenz durch Inhibitoren liegt vor, wenn die Pflanze Faktoren ausprägt, die die Virusreplikation oder -ausbreitung behindern. Dazu gehört beispielsweise das „gene silencing“, bei dem die Pflanzenzelle RNA erkennt, die in (zu) großen Mengen in der Zelle produziert wird, und durch die Synthese von Ribonucleotidoligomeren, die komplementär an Abschnitte der überzähligen RNA binden, für den Abbau durch zelleigene RNasen markiert (s. Kapitel 1.4.3.1 „Posttranscriptional gene silencing“ auf S. 23).

- **Resistenz als „Fehlen von Anfälligkeit“**

Sie liegt vor, wenn für die virale Multiplikation oder Verbreitung notwendige pflanzliche Genprodukte nicht vorhanden sind.

- **Behinderung des Zell-zu-Zell-Transports der Viren**

Das virale Genom gelangt in der Regel als Nucleinsäure-Protein-Komplex durch plasmodesmatische Verbindungen symplastisch in benachbarte Zellen. Teilweise sind für diesen Transport spezielle Proteine, teilweise das Hüllprotein des Virus erforderlich (s. Kapitel 1.3.1.3 „Genom und Genprodukte“ auf S. 4). Die Ausbreitung durch Plasmodesmata kann von der Pflanze beispielsweise durch deren Verengung oder Verschluss mit Callose verhindert werden. Auch die hypersensible Reaktion kann die lokale Verbreitung des Virus im Gewebeverband unterbinden (s. Kapitel 1.5.1 „Die pflanzliche Hypersensibilitätsreaktion“ auf S. 32).

- **Behinderung der systemischen Ausbreitung des Virus**

Für den Langstreckentransport in der Pflanze sind Viren auf den Transport im Phloem angewiesen. Für den viralen Eintritt in das und den Austritt aus dem Phloem müssen Barrieren bei den hochselektiven pflanzlichen Be- und Entladungsvorgängen überwunden werden. Die Mechanismen viralen Langstrecken-

transports unterscheiden sich deshalb zumeist von denjenigen der lokalen Ausbreitung (KOBORI et al. 2000).

- **Behinderung der Symptomausprägung**

Bestimmte Pflanzen sind in der Lage, die Ausprägung der typischen Krankheitssymptome zu unterbinden. Diese Fähigkeit wird als Resistenz der Symptomausprägung bezeichnet. Derartige Genotypen sind als tolerant einzustufen.

- **Verhinderung der Übertragung von Viren durch Pollen und/oder Samen**

Viele Viren werden über Pollen auf andere Pflanzen übertragen oder dringen in die sich entwickelnden Embryonen ein, so dass die sich daraus entwickelnden Nachkommen virusinfiziert sein können. Pflanzen können Mechanismen gegen diese Übertragungswege entwickeln.

Resistenzen können außer nach dem Ort im viralen Replikationszyklus, an dem sie wirksam werden, auch nach anderen Gesichtspunkten unterteilt werden:

- **präformierte und induzierte Resistenz**

Sind die Resistenzmechanismen gegen das Virus bereits voll ausgeprägt, bevor die Infektion mit dem Virus erfolgt, spricht man von präformierter oder konstitutiver Resistenz. Beispiele hierfür sind die Vektorresistenz oder die Resistenz durch Vermeidung von Anfälligkeit. Werden Resistenzmechanismen erst ausgeprägt, nachdem die Infektion stattgefunden hat, so werden diese unter der Bezeichnung induzierte Resistenz subsumiert. Dazu zählt die erworbene Resistenz, bei der die Pflanze nach dem Kontakt mit dem Erreger ein chemisches Signal (oft Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethen und *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine)) generiert, das in von der Infektionsstelle entferntere Gewebebereiche transportiert wird und dort Reaktionen auslöst, die auf eine Verhinderung der Virusausbreitung in diese Regionen abzielen. Dieses Signal kann entweder lo-

kal in die Gewebebereiche, die die Infektionsstelle unmittelbar umgeben, oder bis in weit von der Infektionsstelle entfernte Bereiche der Pflanze transportiert werden. Letztere Form wird als systemische, erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance* (SAR)) bezeichnet. Voraussetzung für induzierte Resistenz ist die Erkennung des Virus durch die Zelle (s. Kapitel 1.5.1.3 „Auslösung der HR und genetische Grundlagen“ auf S. 35) (HULL 2002).

- **qualitative und quantitative Resistenz**
KEGLER et al. (1993) entwerfen – basierend auf der phänotypisch erfassbaren Art der Ausprägung einer Virusresistenz in einer Pflanzenart – das Modell der quantitativen und qualitativen Resistenz. Die qualitative oder Lokalisierungsresistenz ist phänotypisch durch eine Ja-Nein-Reaktion gekennzeichnet, d. h. entweder erkrankt die infizierbare Pflanze nach Virusbefall und zeigt typische Symptome, oder sie erkrankt nicht; dann ist es der Pflanze möglich gewesen, die Ausbreitung des Erregers auf nur wenige Zellen zu beschränken. Als Beispiele nennt er die extreme Resistenz und die Hypersensibilitätsresistenz. Bei extremer Resistenz ist nach Inokulation mit dem Virus keine phänotypische Veränderung feststellbar.

Die quantitative Resistenz manifestiert sich in der unterschiedlichen Symptomausprägung von Genotypen einer Art gegenüber einem Virus. Es gibt Übergangsformen zwischen leichten und schweren Krankheitssymptomen und damit ein breites Spektrum zwischen Sensibilität und Toleranz. Kennzeichen ist die fehlende Lokalisierung des Erregers, er kann sich also systemisch in der Pflanze ausbreiten. Unterschiede gibt es aber in der Viruskonzentration. Viruskonzentration und Symptomausprägung sind hochgradig umweltabhängig (KEGLER 1992 und KEGLER et al. 1993). Quantitative Resistenz führt meist zu einer wirt-

schaftlich entscheidenden Verringerung der Anzahl systemisch erkrankter Pflanzen im Feld (Feldresistenz) (KEGLER et al. 1993). Der Begriff Feldresistenz ist aber zu eng gefasst, wenn er nur auf die quantitative Resistenz bezogen wird. So kommen beim Anbau qualitativ resistenter Genotypen im Feld unter natürlichen Infektionsbedingungen keine systemisch erkrankten Pflanzen vor, weshalb auch diese Sorten als feldresistent zu bezeichnen sind.

KEGLER et al. (1993) gehen davon aus, dass die qualitative in der Regel mono- oder oligogen, die quantitative Resistenz meist oligo- oder polygen codiert wird.

1.4.3 Mechanismen der Virusresistenz

Entsprechend vielfältig wie die Formen der Resistenz sind die Hypothesen, die zu ihrer Erklärung aufgestellt worden sind. Die Beschreibung derselben würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Lediglich wichtige Beispiele für Mechanismen der Virusresistenz seien kurz erwähnt:

1.4.3.1 Posttranscriptional gene silencing

Posttranscriptional gene silencing (PTGS) ist ein Mechanismus zur Abwehr von in die Zelle eingedrungenen, artfremder Nucleinsäure. Im Prinzip wird dabei eine doppelsträngige RNA gebildet und nachfolgend von speziellen RNasen in kurze Bruchstücke zerschnitten. Doppelsträngige virale RNA liegt während des viralen Replikationszyklus vor. Unklar ist, wie genau PTGS ausgelöst wird. Sicherlich spielt dabei die Konzentration der doppelsträngig vorliegenden viralen RNA eine Rolle; erst, wenn ein bestimmter Schwellwert überschritten ist, wird das PTGS eingeleitet (WATERHOUSE et al. 1999). Genutzt wird dieser Mechanismus bei der gentechnischen Veränderung von Pflanzen zur Erzeugung von Virusresistenz: Es wird ein Konstrukt ins Pflanzengenom eingebracht, das neben einem geeigneten Promotor einen Teil des Virusgenoms in Sense- und in Antisense-Orientierung enthält. Nach deren Transskription in der Pflanzenzelle bilden

sich durch komplementäre Basenpaarung doppelsträngige RNA-Moleküle (häufig liegen sie als sog. hairpin-RNA vor), die ab dem Erreichen einer bestimmten Konzentration durch PTGS abgebaut werden. Dringt das Virus nun in die Zelle ein, wird dessen RNA ebenfalls abgebaut, nachdem sie mit komplementärer RNA einen Doppelstrang gebildet hat (DREWS et al. 2004).

PTGS kann von Viren durch verschiedene Strategien überwunden werden (BRIGNETI et al. 1998) und ist abhängig von Umweltfaktoren; es kann durch systemische Signale in entfernten Bereichen der Pflanze induziert werden. (HULL 2002, DREWS et al. 2004). Der pflanzeneigene Abwehrmechanismus, der prinzipiell gegen alle RNA-Viren wirksam ist, ist hilfreich für die Erklärung vieler beobachteter Resistenzformen. So ist vermutlich PTGS dafür verantwortlich, dass auf der Blattspreite selbst anfälliger Sorten Bereiche mit sehr niedriger Viruskonzentration verbleiben, die als grüne Inseln bezeichnet werden. Sie bilden zusammen mit den benachbarten Chlorosen die typischen Virusmosaiken (ebda.).

1.4.3.2 Cross protection

Wird eine Pflanze, die eine gewisse Zeitspanne zuvor mit einem Virus infiziert wurde, von einem nahe verwandten Virus oder einem anderen Virusstamm des gleichen Virus, gegen den die Pflanze bei Einzelinfektion nicht resistent ist, befallen, so kann die Vermehrung und Ausbreitung dieses zweiten Virus stark gehemmt sein. Dieses „*cross protection*“ genannte Phänomen kann mit der Induktion von PTGS nach Inokulation mit dem ersten Virus erklärt werden (BAULCOMBE 1999, DREWS 2004).

1.4.3.3 Hypersensibilitätsreaktion

Hypersensibilität als Mechanismus der Virusresistenz wird detailliert in Kapitel 1.5.1 „Die pflanzliche Hypersensibilitätsreaktion“ auf S. 32 behandelt.

1.4.4 Scharkaresistenzzüchtung

Die Schaffung einer Population mit genetisch fixierter Variabilität zwischen den Individuen und die nachfolgende zielgerichtete Selektion einzelner Individuen aus der Gesamtheit der Population wird als Züchtung bezeichnet. Soll die Schaffung der Population nicht dem Zufall überlassen werden (freie Abblüte), sondern werden die Blüten einer Muttersorte mit dem Pollen einer Vatersorte bestäubt (Kombinationszüchtung), um die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von Individuen mit der gewünschten Kombination definierter Eigenschaften in der Zuchtpopulation zu erhöhen, so ist zunächst die überlegte Auswahl der Elternsorten notwendig. Im Falle der Scharkaresistenzzüchtung wird man hierfür Sorten wählen, die bestimmte Merkmale von Toleranz und Resistenz zeigen. Dazu sind als Entscheidungsgrundlage Daten über das Resistenzniveau der verfügbaren Kreuzungspartner erforderlich. Diese werden in Resistenztests ermittelt. Wichtig ist es, auch Genotypen, die aufgrund schlechter pomologischer Merkmale für den Marktanbau kaum in Frage kommen, zu erhalten und zu prüfen, da sich unter ihnen wertvolle Resistenzträger befinden können; dies gilt gleichfalls für verwandte Arten (z. B. *Prunus spinosa* oder *Prunus cerasifera*).

1.4.4.1 Resistenzprüfung

Vor diesem Hintergrund bzw. primär, um aus dem vorhandenen Sortiment diejenigen Sorten zu selektieren, mit denen in Scharkabfallgebieten ein gewinnbringender Anbau der Europäischen Pflaume aufrecht erhalten werden kann, wurden in den vergangenen Jahrzehnten viele Resistenztests angestellt. Bereits ATANASOFF (1935) äußerte die Vermutung, dass im vorhandenen Sortiment und mit Hilfe von Züchtung scharkatolerante Sorten zu erhalten sind.

Für die Resistenzprüfung sind folgende Faktoren zu berücksichtigen:

1 Virusisolat

Das Virusisolat kann großen Einfluss sowohl auf die Symptomausprägung, also die Reaktion der Pflanze auf den Virus-

befall, als auch auf den Grad der Anfälligkeit, also das Verhalten des Virus in der Pflanze, haben (s. Kapitel 1.3.1.4 „Virusstämme“ auf S. 6 und Kapitel 1.3.2.2 „Symptome“ auf S. 10). Für die Scharka-resistenztestung eignen sich insbesondere Isolate, die in der Pflanze einen hohen Virustiter erreichen (hierin bestehen beträchtliche Unterschiede) und starke Krankheitssymptome hervorrufen, beispielsweise das von KEGLER (1990) beschriebene PPV-Isolat aus der Pflaumensorte 'Cambride Gage'. Nicht weniger wichtig ist aber die Testung mit mehreren, differierenden PPV-Isolaten, um die isolatbedingten Effekte bei der Beurteilung der Scharkaempfindlichkeit eines Genotyps abzuschätzen.

2 Inokulationsmethode

Prinzipiell kommen das Abreiben der Blattspreite mit virushaltigem Pflanzenpresssaft sowie die Übertragung durch Vektoren oder durch Veredlung virusbefallener Pflanzenteile auf gesunde in Frage. Erstgenannte Möglichkeit scheidet bei der Zwetsche aus (s. Kapitel 1.3.1.6 „Übertragung und Verbreitung“ auf S. 8). Blattlausübertragung kommt den unter Freilandbedingungen herrschenden Verhältnissen nahe, ist kontrolliert aber nur unter sehr hohem Aufwand durchführbar, zumal mit verschiedenen Vektoren getestet werden sollte, um vektorartspezifische Einflüsse auf die Übertragung zu vermeiden. Überlässt man die Testung dem natürlichen Vektordruck im Freiland, so sind die Ergebnisse stark vom vorhandenen Infektionsdruck (Populationsdynamik des Vektors, Anzahl infizierter Bäume pro Flächeneinheit, Hauptwindrichtung, Baum- und Reihenabstände) abhängig und schwanken sehr stark von Jahr zu Jahr. Die größtmögliche Kontrolle der Faktoren, die die Inokulation und die sich anschließende Infektion beeinflussen, ist durch Veredlung möglich: Rindenschilde (Chips) mit oder ohne Blattknospen oder ganze Edelreiser können auf gesunde Pflanzen veredelt

werden, ebenso gesunde auf PPV-infizierte Pflanzen. Eine zuverlässige Möglichkeit zur Standardisierung von Resistenztests bietet die Doppelpfropfung: Dabei wird eine PPV-infizierte Zwischenveredlung zwischen die gesunde Unterlage und das Reis des zu testenden Genotyps geschaltet (FUCHS et al. 1994). Alternativ kann auf Unterlagen veredelt werden, die im Vorjahr z. B. über Rindenspäne infiziert worden waren.

3 Verhältnis von Inokulum und Baumgröße

Die Symptomausprägung ist in der Regel umso stärker, je größer das Inokulum und je jünger, kleiner oder durch Umweltfaktoren geschwächer die inokulierte Pflanze ist. Ab einem bestimmten Alter werden viele Sorten der Europäischen Pflaume nicht mehr vollsystemisch mit PPV infiziert („Altersresistenz“, s. S. 9).

4 Bonitur

Um die Vergleichbarkeit der Aussagen zum Resistenzgrad zwischen den Genotypen und zwischen verschiedenen Untersuchungen zu gewährleisten, ist es neben der einheitlichen Wahl der bewerteten Symptome (mit adäquater Boniturskala) notwendig, Standardsorten im Resistenztest mitzuführen. Als anfällige Genotypen der Europäischen Pflaume eignen sich hierfür etwa 'Hauszwetsche' oder 'Italiener', als Resistenzstandards 'Opal', 'Cacanska Najbolja' ('Cacaks Beste') oder, im Fall der Hypersensibilitätsresistenz, 'Jojo'.

5 Zeitpunkt der Inokulation

Der Zeitpunkt der Inokulation in der phänologischen Entwicklung der Pflanze hat entscheidenden Einfluss auf den Erfolg. Blattlausinokulationen im Spätherbst vor dem Blattfall bringen aller Wahrscheinlichkeit nach keinen Erfolg. Rindenspaninokulationen im August oder September führen in der Regel erst im nächsten Jahr zur Ausprägung von Symptomen (ATANASOFF 1935).

6 Beobachtungszeitraum

In manchen Genotypen manifestiert sich die Scharkakrankheit erst mehrere Jahre nach der Inokulation (KEGLER 1990). Deshalb ist, zumindest für die Beurteilung von Fruchtsymptomen, eine wenigstens fünfjährige Versuchsdauer erforderlich, wodurch bei Freilandversuchen zudem der Einfluss jahresspezifischer Witterung auf das Testergebnis minimiert wird.

7 Anzahl der getesteten Bäume

Aussagen über Inokulationserfolge und Scharkaanfälligkeit können nicht an Einzelpflanzen getroffen werden. Mitunter bleiben nach künstlicher Inokulation etliche Bäume befallsfrei, während einzelne starke Symptome zeigen. Bei natürlicher Infektion über Blattläuse im Freiland tritt diese Problematik besonders hervor.

8 Standort

Je nach biotischen und abiotischen Umweltverhältnissen ändert sich die Reaktion einzelner Genotypen auf die Infektion mit dem Scharkavirus. Deswegen fordert MINOIU (1994), vergleichende Scharkaresistenztests in mehreren Ländern durchzuführen.

Legt man an die in den seit der ersten Beschreibung der Scharkakrankheit durchgeführten Resistenztests alle obig genannten Kriterien an, so muss konstatiert werden, dass die meisten Studien wichtige Parameter bei der Anlage des Versuchs oder bei der Deutung der Ergebnisse nicht berücksichtigen; zumindest aber ist die Vergleichbarkeit der Resultate nur in seltenen Fällen gegeben. Aussagen über die Scharkaanfälligkeit eines Genotyps sind meist nur bezogen auf einen Virusstamm und beschränkt auf eine bestimmte Region möglich. Mitunter kommen verschiedene Autoren bei ein und derselben Sorte zu konträren Aussagen. Dies erschwert die Nutzung dieser Untersuchungen für die Praxis und für die Auswahl der Elternsorten in der Resistenzzüchtung. DOSBA et al. (1994) stufen beispielsweise die Sorte 'Ersinger' als resistent ein, da sie kaum Blattsymptome feststellen konnten. Sie beobachteten sogar eine Gesundung der Pflanze nach

zwei Vegetationsperioden, nach denen sie per ELISA kein Virus mehr nachweisen konnten. HAMDORF und HEIN (1989) betrachteten diese Sorte als empfindlich bezüglich der Blattsymptome, auch die Früchte zeigten Marmorierungen, waren aber meist vermarktungsfähig. Die Bäume dieser Sorte blieben über alle Jahre hinweg scharkainfiziert. Mitunter entwickelten sich auf den Blättern sogar Nekrosen.

Zuverlässige Ergebnisse aus Scharkaresistenztests erzielten TRIFONOV (1978), ZAWADZKA (1980), SUTIC und RANKOVIC (1981), KEGLER (1990) sowie PETRUSCHKE und SCHRÖDER (1999), weil sie die Bäume künstlich mit PPV inokulierten. Im Unterschied zu den anderen genannten Autoren, die die Testbäume durch Einveredeln PPV-infizierter Rindenspäne infizierten, veredelte PETRUSCHKE die zu testenden Sorten auf bereits infizierte Unterlagen und führte damit den strengsten Resistenztest durch.

Für die Selektion der Eltern für die Kreuzungszüchtung schlägt KEGLER (1990) drei Auswahlkriterien vor: die Symptomstärke, die Viruskonzentration und das Ausmaß der systemischen Virusverbreitung. Werden kaum Scharkasymptome sichtbar, ist die Viruskonzentration niedrig und bleibt der Virusbefall auf kleine Bereiche der Pflanze beschränkt, so eignet sich der Genotyp als Kreuzungspartner, weil er Resistenzträger ist. Diese drei Parameter eignen sich in Übereinstimmung mit den eingangs angeführten Definitionen von Resistenz und Toleranz zur Abschätzung des Resistenzniveaus eines Genotyps.

KEGLER (1990) unterscheidet im Fall der Resistenz der Europäischen Pflaume gegen das Scharkavirus zwei Formen, die vorherrschende quantitative und die seltene qualitative, die bislang nur in Form der Hypersensibilitätsresistenz bekannt ist. Immunität ist in keinem Fall nachgewiesen (HARTMANN und PETRUSCHKE 2000, GRÜNTZIG et al. 2001). In den nachfolgenden Ausführungen wird die nicht auf Hypersensibilität beruhende Scharkaresistenz der Europäischen Pflaume stets als quantitative Resistenz bezeichnet. Die Resistenz durch Hypersensibilität wird in Kapitel 1.5.2 „Überblick über die Hypersensibilität von *Prunus domestica* L. gegenüber PPV“ auf S. 37 beschrieben. Die Ausführungen in die-

Tab. 1.4–1 Frucht- und Blatttoleranz ausgewählter Sorten der Europäischen Pflaume gegenüber PPV (nach HAMDFORD und HEIN 1989, HARTMANN 1990 und 2005, RÜHL 1994, MINOIU 1997, PETRUSCHKE 2005)

Sorte	Blatt-toleranz ^a	Frucht-toleranz ^a	Sorte	Blatt-toleranz ^a	Frucht-toleranz ^a
Hoh 1468	–	–	Katinka	–	+
Anna Späth	–	o	Königin Viktoria	–	o
Auerbacher	–	–	Mirabelle von Nancy	+	+
Bühler Frühzwetsche	o	+	Jalomita	–	_ ^b
Cacaks Beste	+	+	Ontariopflaume	+	+
Cacaks Fruchtbare	–	–	Opal	+	+
Cacaks Schöne	o	+	Ortenauer	–	–
Cacaks Frühe	^c	+	Ouillins Reneklode	+	+
Carpatin	–	+	Pitestean		+
Centenar	–	+	Presenta	–	+
Chrudimer	+	+	President	o	+
Czernowitzer	+	+	Ruth Gerstetter	–	+
Elena	–	+	Sanctus Hubertus	o	+
Ersinger	–	+	Stanley	o	+
Fellenberg	–	–	Sugartop	+	–
Felsina	–	–	Tegera	–	–
Große Grüne Reneklode	–	o	Topend	+	–
Habella (Hoh 4515)	o	–	Tophit	o	o
Haganta	o	o	Topper	o	+
Hanita	–	+	Topfive	–	+
Haroma (Hoh 4593)		+	Valjevka	o	+
Hauszwetsche in Typen	–	–	Valor	+	_ ^b
Herman	o	+	Zimmers Frühzwetsche	–	–

a – empfindlich

o schwach empfindlich/schwach tolerant

+ tolerant

b Die Sorte zeigt wurde in den 1980er Jahren als fruchttolerant beschrieben, zeigt in den letzten Jahren aber stärkere Fruchtsymptome.

c Wo sehr uneinheitliche oder erst kurzfristige Ergebnisse vorliegen, wurde auf Angaben verzichtet.

sem Kapitel beziehen sich auf die quantitative PPV-Resistenz.

Als frucht- und blatttolerant ist seit langem die ‘Mirabelle von Nancy’ bekannt (TRIFONOV 1978). TRIFONOV empfiehlt deswegen, diese und andere Mirabellen als Kreuzungspartner in der Scharkaresistenzzüchtung zu verwenden. Dies wurde in Hohenheim und Geisenheim in jüngeren Jahren versucht. Die Nachkommen tragen allerdings runde, kleine Früchte, so dass sich

dieser Ansatz für die Züchtung von großfrüchtigen Zwetschen kaum eignet. Detaillierte Auswertungen über den Scharkaresistenzgrad in den Nachkommenschaften liegen nicht vor.

Der Toleranzgrad einer Sorte kann sich selbst am gleichen Standort im Laufe der Jahre ändern, wenn sich die das Pflanzenwachstum beeinflussenden Umweltfaktoren verändern. Dadurch können sogar Versuche, die an ein und demselben Standort in gleicher Methodik und

mit dem gleichen Virusstamm durchgeführt wurden, zu differierenden Ergebnissen führen (KEGLER 1992, HARTMANN und PETRUSCHKE 2000).

In Tab. 1.4–1 sind exemplarisch einige Sorten der Europäischen Pflaume hinsichtlich ihrer Blatt- und Fruchttoleranz gegenüber PPV charakterisiert.

1.4.4.2 Vererbung

Zur Vererbung der Scharkaresistenz bei Pflaumen gibt es kaum systematische Untersuchungen, da sich die Arbeiten der letzten Jahrzehnte fast ausschließlich auf die Resistenzprüfung von Sorten konzentrierten. Da in allen bekannten Züchtungsprogrammen die Scharkasymptomausprägung auf den Blättern und vor allem an den Früchten Selektionskriterium war, müssten diese Bemühungen – um korrekt zu sein – unter dem Begriff Toleranzzüchtung zusammengefasst werden. Zumeist wurden nur Genotypen, die pomologisch herausragende Eigenschaften besitzen, der Toleranzprüfung unterzogen, so dass aus den verfügbaren Daten keine Rückschlüsse auf die Vererbung der Merkmale Scharkatoleranz oder quantitative Scharkaresistenz zu ziehen sind.

In den Fällen, in denen ganze Kreuzungsnachkommenschaften in die Prüfung miteinbezogen wurden, wurde eine unzulängliche Testmethode angewandt. MINEV und DRAGOISKI (1995) beispielsweise untersuchten Kreuzungsnachkommen interspezifischer Hybriden zwischen *Prunus spinosa*, *P. domestica* und *P. cerasifera*. Die Sämlinge wurden im Feld unter „hohem Scharkadruck“ aufgepflanzt und über mehrere Jahre auf Befehl untersucht (visuelle Bonitur und ELISA). Einige Sämlinge blieben befallsfrei, woraus die Verfasser schließen, dass interspezifische Hybriden der genannten Arten ein hohes Maß an Potential für die Scharkaresistenzzüchtung besitzen. Diese Schlussfolgerung kann aus dem Versuch nicht abgeleitet werden, da die Bäume nicht künstlich mit PPV inokuliert wurden. Die Ergebnisse sind deshalb für die Erforschung der Vererbung der Scharkaresistenz weitgehend wertlos. Vergleichbar ist die Studie von LAHMATOVA et al. (1998) einzustufen. Auch in diesem Fall erfolgten

keine kontrollierten Inokulationen bei der Überprüfung des Resistenzgrades von Nachkommenschaften aus wechselseitigen Kreuzungen resistenter, toleranter und empfindlicher Sorten. Die Autoren postulieren, dass der Anteil scharkaresistenter Nachkommen höher ist, wenn der PPV-resistente Elternteil maternell verwendet wird. Auch diese Aussage muss in Frage gestellt werden, da vom methodischen Vorgehen her nicht sichergestellt werden konnte, dass alle Genotypen einem gleichen, hohen Infektionsdruck ausgesetzt waren.

Einen methodisch korrekten Ansatz hingegen verfolgten BIVOL et al. (1988). Sie testeten Nachkommenschaften von Pflaumen auf Scharkaresistenz, indem sie die Sämlinge vegetativ vermehrten, jeweils einige Pflanzen künstlich mit PPV inokulierten und andere dem natürlichen Befallsdruck aussetzten. Bei Elternsorten mit quantitativer Resistenz fanden sie eine mehrfaktorielle Vererbung dieses Merkmals. In aller Regel lag der Resistenzgrad der Sämlinge zwischen denjenigen der Elternsorten. Lediglich bei der Kreuzungskombination ‘Graf Althanns Reneklode’ × ‘Kirkes’ übertrafen einige Nachkommen den Resistenzgrad der Eltern. Im Allgemeinen führte die Kreuzung zweier quantitativ resistenter Eltern nicht zu einer Erhöhung des Resistenzgrades bei den Nachkommen.

Bei Kreuzungen von toleranten mit quantitativ resistenten Sorten ergab sich eine Vererbbarkeit von 26% für die PPV-Toleranz. Einen hohen Anteil PPV-fruchttoleranter Nachkommen fanden BIVOL et al. (1989) bei Verwendung der Sorte ‘Kirkes’ (67–78%), einen sehr geringen Anteil aber bei den Sorten ‘Graf Althanns Reneklode’, ‘Anna Späth’, ‘Montfort’, ‘Prune d’Agen’ und ‘Tuleu Gras’ als Eltern. ‘Kirkes’ scheint sich also sehr gut als Donor für Scharkatoleranz zu eignen.

1.4.4.3 Bewertung der Resultate der Scharkaresistenzzüchtung

In den zurückliegenden Jahrzehnten wurden an vier Orten erfolgreich und in größerem Umfang quantitativ scharkaresistente bzw. fruchttolerante Sorten der Europäischen Pflaume gezüchtet:

- Aus Cacak im ehemaligen Jugoslawien stammen die in den 1970er Jahren herausgegebenen Sorten ‘Cacaks Beste’ (‘Cacanska najbolja’) und ‘Cacaks Schöne’ (‘Cacanska lepotica’). Erstere ist scharkaresistent und wurde in zahlreichen nachfolgenden Züchtungsprogrammen verwendet, ist aber ertragsschwach und im Anbau deswegen nicht verbreitet; letztere ist scharkatolerant und sehr ertragreich, weswegen sie eine weite Verbreitung erfahren hat. Vor allem diesen Neuzüchtungen aus Cacak ist die Erhaltung des Anbaus der Europäischen Pflaume in den Scharkabefallsgebieten zu verdanken. Die Fruchtqualität dieser Sorten befriedigt nicht immer.
- In Pitestean in Rumänien wurden ebenfalls Sorten gezüchtet, die für den Anbau in Scharkabefallslagen geeignet sind, darunter die Sorten ‘Pitestean’ und ‘Centenar’.
- In Hohenheim wird seit 1980 Zwetschenzüchtung betrieben. Bislang wurden als scharkatolerante Sorten ‘Hanita’, ‘Haganta’, ‘Katinka’, ‘Elena’ und ‘Presenta’ in die Praxis eingeführt.
- Die Geisenheimer Zwetschenzüchtung nahm 1983 ihren Anfang. Auch aus ihr sind wertvolle, scharkatolerante Sorten hervorgegangen, z. B. ‘Topper’ und ‘Top-five’.

Wie von ATANASOFF (1935) vermutet, gelang es durch Kreuzungszüchtung, fruchttolerante Sorten der Europäischen Pflaume zu züchten und so den Anbau in Scharkabefallsregionen aufrechtzuerhalten. Zweierlei Probleme treten jedoch bei der Verwendung quantitativ resistenter Sorten auf:

- Sofern kaum scharkabedingte Blattsymptome sichtbar werden, wird eine Infektion des Baumes äußerlich kaum erkannt. Problematisch ist dies für bislang befallsfreie Gebiete, da die Virose über latent infiziertes Pflanzmaterial dort eingeschleppt werden kann und befallene Bäu-

me aufgrund der mangelnden Symptomausprägung nur schwer erkannt werden.

- In den zurückliegenden Jahren traten an Sorten, die bislang als fruchttolerant galten, vermehrt Scharkasymptome auf (s. S. 27). So bewertete HARTMANN (1990) die Sorten ‘Jalomita’ und ‘Valor’ als fruchttolerant; infolge veränderter Umwelteinflüsse zeigten diese in den darauffolgenden Jahren aber mehr und mehr Symptome, so dass er sie 2005 als fruchtempfindlich einstufte.

Die Nutzung quantitativ resistenter Sorten der Europäischen Pflaume ist für den Anbau in Scharkabefallslagen vorteilhaft, der Grad ihrer Widerstandsfähigkeit kann aber absinken, so dass wirtschaftliche Schäden entstehen. Für scharkafreie Regionen birgt ihr Anbau das Risiko, die Virose unerkannt einzuschleppen.

1.4.4.4 Gentransfer zur Gewinnung scharkaresistenter Sorten der Europäischen Pflaume

Da bisher noch keine pflanzeigenen Scharkaresistenzgene identifiziert werden konnten, beschränken sich gentechnologische Maßnahmen bislang auf die Induktion einer Virusresistenz durch Übertragung von Genomabschnitten des Erregers in das Kerngenom von *Prunus*-Arten. Bei der Gewinnung von virusresistenten Pflanzen durch Gentransfer wird daher ein völlig anderer Ansatz als bei der Kombinationszüchtung verfolgt: Letztere nutzt in den pflanzlichen Populationen vorhandene genetische Variabilität, erstere induziert eine sog. „pathogen-derived resistance“ durch Einführung von Genen ins Kerngenom der Pflanzen, die aus viralen Genomsequenzen abgeleitet wurden (KEGLER et al. 1998).

Hüllproteinvermittelte Resistenz. Basierend auf dem Prinzip des „Cross protection“ (s. Kapitel 1.4.3.2 auf S. 24) wurden bei der Bekämpfung verschiedener Virusarten in der Vergangenheit einige Erfolge erzielt. Beispielsweise können Citrusbäume durch Infektion mit einem milden

Isolat des *Citrus tristeza virus* (CTV) gegen eine nachfolgende Infektion mit bestimmten aggressiven Isolaten desselben Virus geschützt werden (GARNSEY et al. 1998). Probleme können sich aber ergeben, wenn der zur Prämunisierung verwendete, milde Virusstamm an Schadpotential gewinnt. Man erkannte, dass die Übertragung des viralen CP-Gens ins pflanzliche Genom und dessen Expression die gleiche Wirkung hervorrufen kann wie cross protection (BEVAN et al. 1985, STEINBISS, H.-H., 1993). Infolgedessen wurde auch bei Scharkawirtspflanzen versucht, eine derartige Resistenz zu erzielen.

Mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfers gelang es LAIMER DA CÂMARA MACHADO et al. (1992) erstmals, das PPV-Hüllproteingen ins Genom eines Aprikosensämlings (*Prunus armeniaca*) zu integrieren und zur Expression zu bringen. Einige der stabil transformierten Sämlinge erwiesen sich als resistent gegen das Scharkavirus (DA CÂMARA MACHADO et al. 1994 a und b).

SCORZA et al. (1994) konnten ebenfalls das Gen, das für die Capsomere des Scharkavirus-hüllproteins codiert, in verschiedene Sämlinge der amerikanischen Pflaumenhybride 'B 69 158' übertragen. Einer dieser transformierten Sämlinge, der Klon 'C5', zeigte sich im Gewächshaus lange Zeit als resistent gegenüber PPV. In Freilandversuchen konnte er sowohl über Inokulation mittels *chip budding* als auch über natürlich auftretende Blattläuse, die an Wurzel- und Stammausschlägen der Unterlagen saugten, mit dem Scharkavirus infiziert werden. Die Blätter von 'C5' zeigten Scharkasymptome (s. Abb. 1.4–3); die Viruskonzentrationen waren vergleichbar hoch wie in bekannten quantitativ resistenten Sorten (MALINOWSKI et al. 1998 und 2004). Die Menge an Hüllprotein, die in 'C5' produziert wird, ist niedrig; vermutet wird, dass die Widerstandsfähigkeit gegenüber PPV auf PTGS beruht (RAVELONANDRO et al. 1998, HILY et al. 2004).

Die Übertragung des Hüllproteingens in das Pflanzengenom und die Expressierung desselben in der Pflanze kann zu Heteroenkapsidierung führen: Wird die derart transformierte Pflanze, die Virushüllproteinbestandteile synthetisiert, mit einem Virus der gleichen Familie infi-



Abb. 1.4–3 Scharkasymptome auf Blättern des transformierten Klons 'C5', der das Hüllproteingen des Plum pox virus trägt

ziert, so kann es zu Fremdverkapselungen kommen, bei der das Genom des einen Virus in die Hülle des anderen gelangt. Damit einhergehen kann eine Änderung des Wirtskreises oder der Übertragungsart des Virus (BOURDIN und LECOQ 1991). LECOQ et al. (1994) und MAISS et al. (1997) berichten von einer Heteroenkapsidierung in Scharkavirus-hüllprotein synthetisierenden Tabakpflanzen, bei der nicht blattlausübertragbare Viren blattlausübertragbar wurden; durch gezielte Veränderung der ins Pflanzengenom inserierten viralen Sequenz kann die Gefahr einer Heteroenkapsidierung vermutlich stark verringert werden.

Weitere Genomabschnitte als Quellen für Resistenzen. Außer dem Gen für Hüllproteineinheiten wurden andere Gene des PPV in das Genom von krautigen Wirtspflanzen des Scharkavirus übertragen (KORTE et al. 1994). Die Transformation von Sorten des Steinobstes ist allerdings noch nicht gelungen. Beispielsweise wurde das Gen für NIb, das bei Potyviren die Replicase codiert, in das Kerngenom von *Nicotiana benthamiana*, einer krautigen Wirtspflanze des PPV, eingeführt; die hierauf beruhende Resistenz gegenüber PPV beruht vermutlich auf PTGS (LÓPEZ-MOYA et al. 2000).

Beschränkender Schritt bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Gehölze ist die Regeneration vollständiger Pflanzen aus transformiertem, undifferenziertem Gewebe (PETRI und BURGOS 2005). Bislang gelang eine effiziente Transformation und Regeneration von *Prunus*-Arten nur, wenn Sämlingspopulationen als Ausgangsmaterial verwendet wurden (LÓPEZ-MOYA et al. 2000, SRINIVASAN et al. 2005). LÓPEZ-MOYA et al. (2000) folgern, dass mit biotechnologischen

Methoden derzeit keine Verbesserung des Steinobstsortiments hinsichtlich einer Widerstandsfähigkeit gegenüber PPV möglich ist. PETRI und BURGOS (2005) sprechen der Transformation allgemein eine Bedeutung in der Verbesserung des Obstsortiments zu, rechnen aber nicht mit einem baldigen Durchbruch in der Anwendung, da die Entwicklung eines Transformations- und Regenerationsprotokolls, das für mehrere Genotypen einer Obstart anwendbar wäre, nicht in Sicht ist.

1.5 Notwendigkeit der Nutzung der Hypersensibilitätsresistenz zur Züchtung scharkaresistenter Sorten

Im Folgenden wird die pflanzliche Hypersensibilitätsreaktion in ihren Grundzügen dargestellt. Dabei werden sowohl biochemische Vorgänge, die die Reaktion bedingen oder begleiten, als auch ihre genetische Determinierung berücksichtigt. Abschließend wird der Stand des Wissens über die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume dargelegt. So wird ersichtlich, weshalb es sinnvoll ist, die Hypersensibilität gegenüber PPV in der Züchtung der Europäischen Pflaume zu nutzen. Vor diesem Hintergrund werden die Zielstellungen der in den Folgekapiteln dargelegten Untersuchungen formuliert.

1.5.1 Die pflanzliche Hypersensibilitätsreaktion

1.5.1.1 Definition und biologische Funktion

STAKMANN (1915) führt den Begriff Hypersensibilität am Beispiel der Wirt-Parasit-Beziehung zwischen Getreide und einem Rostpilz ein. Er versteht darunter den „abnormal schnellen Tod von Wirtspflanzenzellen“ nach Infektion mit dem Pathogen. GOODMAN und NOVACK (1994) definieren ihn als „den raschen Tod pflanzlicher Zellen in Verbindung mit der Begrenzung pathogenen Wachstums“. Mit dieser Definition ist der primäre biologische Sinn der Hypersensibilität ausgedrückt: Die Pflanze erliegt der Pathogeninfektion nicht, sondern begrenzt den Schaden auf den Verlust weniger Zellen (JABS und SLUSARENKO 2000). Diese Funktionalität ist dann gegeben, wenn der Schaderreger sich in den abgestorbenen Zellen nicht mehr vermehren kann (für Viren als obligate „Zellparasiten“ ist dies anzunehmen) und das Pathogen, das die Hypersensibilität bedingt, sich vor Vollendung des hypersensiblen Zelltodes nicht in angrenzendes, gesundes Gewebe hinein verbreiten kann (FRASER 1987).

Für den Terminus „Hypersensibilität“ werden auch die Begriffe „*hypersensitive response*“ und „*hypersensitive reaction*“ (HR) verwen-

det. HR kann in Pflanzen als Reaktion auf Befall mit Viren, Bakterien und Pilzen auftreten, gelegentlich kann sie auch durch tierische Schaderreger ausgelöst werden (JABS und SLUSARENKO 2000).

Die abgestorbenen Zellen werden in der Regel als Nekrosen sichtbar. In seltenen Fällen ist die HR symptomlos oder nur auf mikroskopisch sichtbare Bereiche beschränkt, da nur eine oder sehr wenige Zellen absterben, wie SULZINSKI und ZAITLIN (1982) am Beispiel des Tabakmosaikvirus (TMV) zeigen. Die HR kann, muss aber nicht auf Zellen beschränkt sein, die unmittelbar mit dem Erreger in Kontakt gekommen sind (HEATH 2000).

Zur HR gehört nach HEATH (2000) nicht nur der rasche Zelltod, sondern auch die Auslösung anderer Resistenzmechanismen, die die Pathogenausbreitung hemmen und in den später absterbenden und jenen benachbarten Zellen wirksam werden. Dennoch kann es vorkommen, dass diese Resistenzmechanismen nicht ausreichen, um die vollständige Lokalisierung des Erregers sicherzustellen.

Das mit der HR verknüpfte Absterben von Zellen läuft nach dem Muster des programmierten Zelltods (*programmed cell death* (PCD)) ab. Unter PCD versteht man den durch bestimmte auslösende Faktoren von der Zelle selbst eingeleiteten, im Ablauf genetisch determinierten und auf die Bereitstellung von Energie angewiesenen Zelltod (LEVINE 2004). PCD ist gewissermaßen ein Teil der HR oder, umgekehrt ausgedrückt, die HR ist der mit der Auslösung von Pathogenabwehrprozessen eng verknüpfte programmierte Zelltod (HEATH 2000).

Die Resistenz durch Hypersensibilität ist neben der extremen Resistenz ein weiterer Mechanismus der Resistenz durch Lokalisierung des Schaderregers (FRASER 1987). Durch die HR kann die Pflanze verhindern, dass die infizierten Zellen dem Pathogen als Quelle für weitere Infektionen dienen. Sie kann auch verstanden werden als „normale und unausweichliche sekundäre

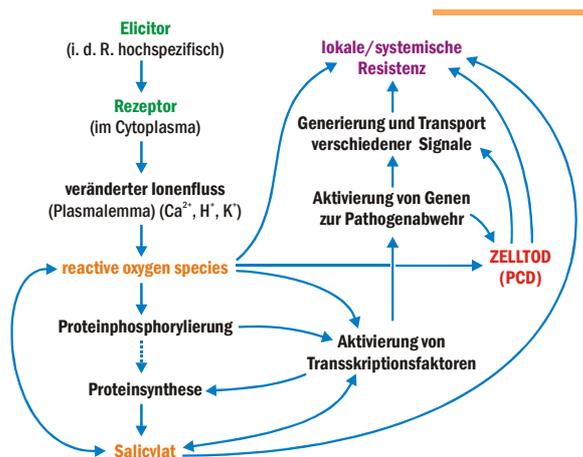


Abb. 1.5-1 Schematische Darstellung des vermuteten Ablaufs der HR und beteiligter Regelmechanismen. PCD=programmed cell death. (inhaltliche Angaben nach ALVAREZ 2000, JABS und SLUSARENKO 2000 und DOKE et al. 2005)

Folge der Veränderungen, die primär zur Lokalisierung [des Schaderregers] führen“ (ebda.).

1.5.1.2 Ablauf der HR

LEVINE (2004) unterteilt die HR in folgende Schritte, die koordiniert in der Zelle ablaufen:

- 1 *oxidative burst*,
- 2 *nitrosative burst*,
- 3 Biosynthese von Phytoalexinen,
- 4 Verstärkung der Zellwand,
- 5 Erzeugung lokal wirksamer Signale für die Einleitung von Abwehrreaktionen in den Nachbarzellen,
- 6 Erzeugung systemisch wirksamer Signale für die Einleitung von Abwehrreaktionen in entfernter gelegenen Gewebebereichen,
- 7 PCD.

Veränderungen im Stoffwechsel. Eine Vielzahl an Untersuchungen liegt zur Frage vor, welche Veränderungen sich im pflanzlichen Stoffwechsel bei Ablauf der HR ergeben. Nachfolgend sollen wesentliche Aspekte kurz angeführt werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass diese Zusammenstellung auf Daten beruht, die an verschiedenen Pflanzenarten nach Auslösung der

HR durch unterschiedliche Viren gesammelt wurden. Rückschlüsse auf eine spezielle Wirt-Parasit-Interaktion, die die HR auslöst, können deshalb nicht gezogen werden. Mitunter lassen sich im Einzelfall nicht alle aufgeführten Veränderungen nachweisen. Abb. 1.5-1 gibt einen stark vereinfachten Überblick über Prozesse, die bei der HR ablaufen.

- **oxidative burst** (JABS und SLUSARENKO 2000, DE GARA et al. 2003, LEVINE 2004) Eine der ersten Antworten der pflanzlichen Zelle auf die Einwirkung von Stress ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species (ROS)) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidationen ($O_2^{\cdot-}$). In Zellen, in denen die HR abläuft, treten zwei Phasen der ROS-Produktion auf: Eine erste mit schwacher Erhöhung der ROS-Aktivität in der Zelle, die als unspezifisch betrachtet wird, da sie in jeder Zelle unmittelbar nach Kontakt mit einem Pathogen auftritt, und eine nachfolgende mit sehr starker Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies. Diese zweite Phase beginnt einige Stunden nach dem Abflauen der ersten Phase und geht mit massiver ROS-Produktion einher, weshalb sie *oxidative burst* genannt wird. Es gilt inzwischen als sicher, dass ROS durch die Aktivierung einer membrangebundenen NADPH-Oxidase gezielt gebildet werden (DOKE et al. 2005).

ROS wie H_2O_2 oder $O_2^{\cdot-}$ und insbesondere ihr Reaktionsprodukt OH^{\cdot} (Hydroxylradikal) führen beispielsweise zur Oxidation von Thiolgruppen von Proteinen, zur Lipidperoxidation und zu Strangbrüchen in der DNA. Hydroxylradikale verursachen auch die Quervernetzung zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen, wodurch die Replikation oder Translation der DNA blockiert wird. Zudem reagieren sie mit einer Vielzahl weiterer zelleigener Verbindungen. Extrazellulär bewirken sie eine Quervernetzung der Zellwand. Über die Lipidperoxidation sind sie an der Veränderung der

Membranpermeabilität und am Verlust der Kompartimentierung der Zelle beteiligt, die letztlich zum Zelltod führt.

ROS wirken auch aktiv gegen die Zelle eindringende Mikroorganismen, doch wird dies nicht als wichtigste Funktion des *oxidative burst* beschrieben. Diese wird in der Auslösung verschiedener Resistenzmechanismen gesehen. JABS (1999) ordnet den ROS in der Anfangsphase der HR eine Signalwirkung zu, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, und sieht sie in der Spätphase der HR als Folge der Veränderung der Permeabilität der mitochondrialen Membran, die zum Zelltod führt. Insofern ist die Produktion von ROS zum einen als Glied in der Kette der Signaltransduktion von der Wahrnehmung des Pathogens hin zur Einleitung der Abwehr zu sehen, zum anderen als Späterscheinung, die in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Verlust der Zellkompartimentierung steht. Diese zieht unweigerlich den Zelltod nach sich.

Die Pflanze kann die ROS-Produktion enzymatisch feinsteuern. Ascorbat und Salicylat, die enzymatisch reduziert werden und so den Redoxstatus der Zelle abgreifen können, wird eine Rolle bei der Aktivierung von Genen zugesprochen, die bei der HR eine Rolle spielen.

- ***nitrosative burst*** (LEVINE 2004)
Stickstoffmonoxid (NO) wird synchron zu ROS in der Zelle produziert; analog spricht man von *nitrosative burst*. NO wird eine synergistische Rolle bei der Auslösung des PCD zugeschrieben.
- Veränderungen in der **Membranpermeabilität**
Eine der zeitlich zuerst einsetzenden Veränderungen – oft bereits wenige Stunden nach Auslösung der HR – ist die Veränderung der Permeabilität biologischer Membranen in der Zelle. Dabei kommt es zu einem Efflux von K^+ -Ionen, der entweder durch eine Erhöhung der Ionen-

diffusionsrate durch die Membran oder durch die Aktivierung spezifischer Ionenpumpen ausgelöst wird (JABS und SLUSARENKO 2000), wobei stets Oxidationsprozesse eine entscheidende Ursache darzustellen scheinen (*oxidative burst*, s. o.). KEPPLER und NOVACKY (1986) berichten von einer Zunahme der Lipidperoxidation während der HR.

- **Phenylpropanoidstoffwechsel** (FRASER 1987 und 2000a)

Phenolische Komponenten wie Chlorogen- und Isochlorogensäuren und das Cumarin Scopoletin akkumulieren vor und während des Sichtbarwerdens der Nekrosen. Die Peroxidase- und Polyphenoloxidaseaktivitäten sind gleichfalls erhöht. Die Nekrosenbildung geht einher mit der Lignifizierung der Zellwände. Es kommt zu einer Neusynthese von Phenylalaninammoniumlyase (PAL) und anderen Enzymen, die am Phenylpropanoidstoffwechsel beteiligt sind. Die Hemmung von PAL führt bei der Interaktion Tabak/TMV zu einer beträchtlichen Vergrößerung der Nekrosen, weshalb Verbindungen des Phenylpropanoidstoffwechsels eine Bedeutung in der Begrenzung der Virusausbreitung zugeschrieben wird (MASSALA et al. 1980). Bei Tabak können erste Veränderungen im Phenylpropanoidstoffwechsel 24 Stunden nach der Auslösung der HR auftreten. Ca. 12 Stunden später werden kleine Nekrosen sichtbar, die sich im Laufe der nachfolgenden Tage vergrößern.

Eng gekoppelt mit dem Phenylpropanoidstoffwechsel ist die Synthese von Salicylsäure (SA). Ihr wird eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des *oxidative burst* und bei der Resistenzinduktion in benachbarten und entfernten Gewebebereichen (SAR) zugeschrieben (ALVAREZ 2000). SA induziert die Bildung einer Reihe von Proteinen, die während der HR akkumulieren (OHASHI 2005).

- **PR-Proteine** (FRASER 1987 und 2000a, b)
Im Laufe der HR werden *pathogenesis related* (PR) *proteins* gebildet. Sie können ca. 48 Stunden nach Auslösung der HR nachgewiesen werden. Ihre Rolle bei der eigentlichen Viruslokalisierung wird aber als gering eingeschätzt.

1.5.1.3 Auslösung der HR und genetische Grundlagen

FLOR (1956) gehört zu den Ersten, die die Beziehung zwischen Pflanzen und ihren Pathogenen genetisch zu erklären versuchten. Er entwickelte am Beispiel des Befalls von Lein mit dem Rostpilz *Melampsora lini* die sog. Gen-für-Gen-Hypothese. Danach ist eine Pflanze, die das dominante Resistenzgen *R* trägt, resistent gegen einen Schaderreger, der das korrespondierende dominante Avirulenzgen *Avr* besitzt. Sobald entweder das Pathogen oder die Wirtspflanze oder beide ihr entsprechendes Gen in rezessiver Form tragen, wird die Resistenzreaktion nicht ausgelöst, und die Pflanze wird vom Pathogen befallen.

Inzwischen ist die Gen-für-Gen-Hypothese für eine Vielzahl von Wirt-Parasit-Interaktionen – sowohl mit Viren und Bakterien als auch Pilzen als Schaderregern – bestätigt (VANDERPLANK 1984). Nach heutigem Verständnis wird angenommen, dass ein vom *R*-Gen determinierter Mechanismus das Pathogen, das versucht, in die Zelle einzudringen oder bereits in sie eingedrungen ist, anhand des vom Avirulenzgen codierten Faktors sehr schnell erkennt und eine effektive Resistenzreaktion einleitet. Sehr häufig ist diese Antwort eine Hypersensibilitätsreaktion (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996). Prinzipiell wird dem *R*-Gen-Produkt eine Funktion als Rezeptor für das *Avr*-Gen-Produkt zugeschrieben (HEATH 2000).

Viele der an verschiedenen Wirt-Parasit-Beziehungen beteiligten *R*- und *Avr*-Gene und ihre Genprodukte sind mittlerweile bekannt (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996, FRASER 2000b, HEATH 2000, HAMMOND-KOSACK und PARKER 2003, LEVINE 2004, SMITH und HULBERT 2005). Die *Avr*-Gene und ihre Proteine unterscheiden sich sehr stark voneinander; hingegen

lassen sich bei der weitaus überwiegenden Zahl der von *R*-Genen codierten Proteine Homologien mit zum Teil stark konservierten Domänen erkennen (ebda.) (s. Abb. 1.5–2):

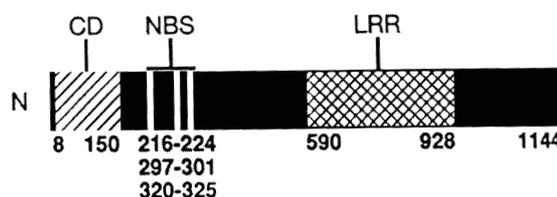


Abb. 1.5–2 Schematische Darstellung des N-Proteins, des Produkts eines R-Gens des Tabaks, das eine HR gegen TMV bedingt. **CD** - vermutete cytoplasmatische Domäne mit TIR-Ähnlichkeiten. **NBS** - nucleotide binding sites. **LRR** - leucin rich repeats. Die Zahlen geben die Lage der Domänengrenzen in der Primärsequenz des Proteins wieder (Aminosäureabfolge, beginnend mit 1 am N-terminalen Ende) (nach DINESH-KUMAR und BAKER 2000, © 2000 by National Academy of Sciences, USA, mit freundlicher Genehmigung)

1 leucin rich regions

Die Proteine besitzen C-terminal eine Aminosäuresequenz mit leucinreichen Wiederholungen (leucin rich repeats (LRR)). Es gibt Hinweise, dass diese Domäne entscheidend für die Pathogenerkennung ist.

2 nucleotide binding sites

Im zentralen Bereich des Proteins befindet sich eine Nucleotidbindungsstelle (NBS); vornehmlich ATP und GTP können daran gebunden werden. Ihnen wird eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der HR zugeschrieben. Derartige Nucleotidbindungsstellen sind typisch für Kinasen.

3 TIR-like rezeptor domain

Bei einer großen Gruppe von Resistenzgenprodukten, die auch als Produkte von Virusresistenzgenen häufig vorkommen, ist eine dritte, N-terminale Domäne nachgewiesen, die nach ihrer Ähnlichkeit mit bei Säugern vorkommenden Toll- und Interleukin-1-Rezeptoren TIR-ähnliche Rezeptordomäne genannt wird. Es

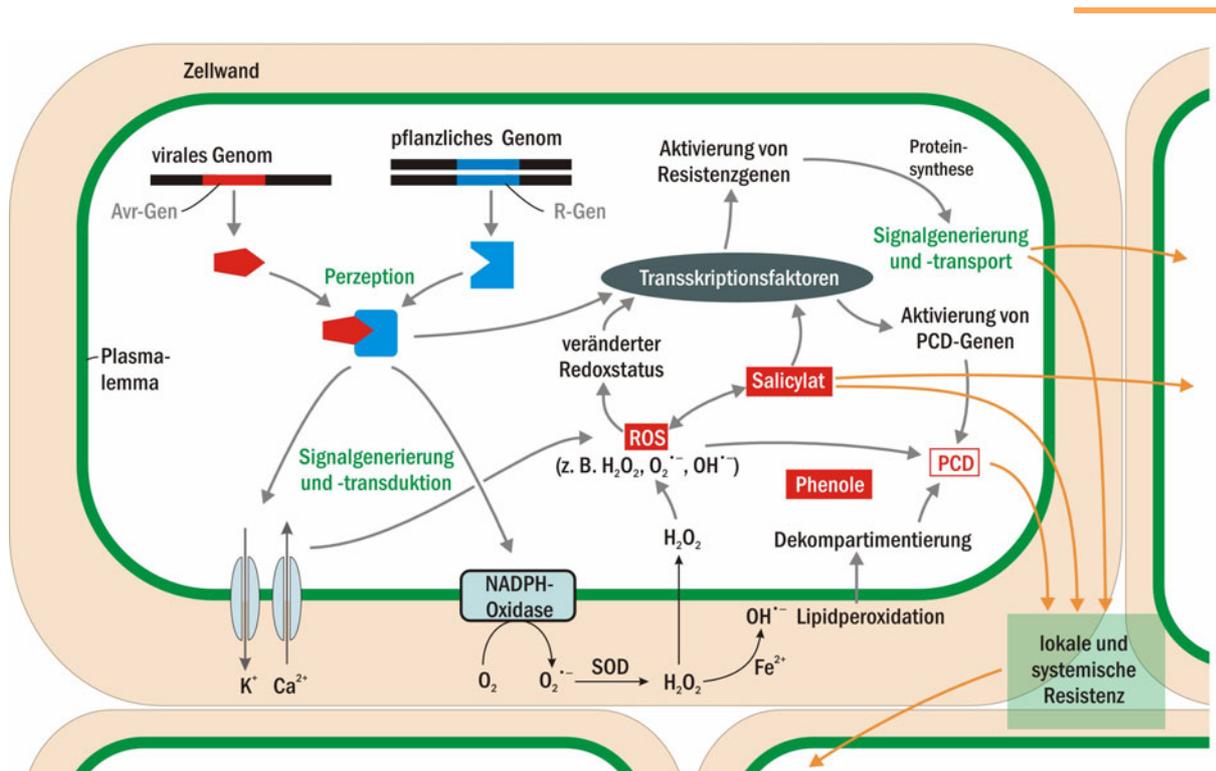


Abb. 1.5-3 Komplexität der Signal- und Stoffwechselwege, die an der Pathogenerkennung und -abwehr durch HR beteiligt sind. Es sind nur einige wesentliche Schritte dargestellt. Das Avirulenzgenprodukt wird vom Resistenzgenprodukt erkannt. Daraufhin werden Ionenströme aus dem und in das Cytoplasma sowie die Generierung von $O_2^{\cdot-}$ durch die plasmalemma-gebundene NADPH-Oxidase aktiviert. In der Zellwand wird durch die Superoxiddismutase (SOD) die Bildung von H_2O_2 katalysiert. Dieses diffundiert durch das Plasmalemma und löst im Cytoplasma ebenso wie die durch die veränderten Ionenkonzentrationen bedingten Signale, die vermutlich durch G-Proteine vermittelt sind, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus. Später setzt durch die Bildung von $OH^{\cdot-}$ -Radikalen Lipidperoxidation ein, die die Plasmamembran schädigt. Im Cytoplasma wird Salicylat gebildet, das eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des oxidativen burst (ROS-Produktion) und in der Resistenzinduktion in benachbarten und entfernten Teilen der Pflanze (lokale und systemische Resistenz) einnimmt. Ebenso wie der durch den oxidativen burst veränderte Redoxstatus der Zelle nimmt Salicylat Einfluss auf Transkriptionsfaktoren, die u. U. auch direkt vom R-Genprodukt nach Perzeption des Avr-Genprodukts reguliert werden können. Dadurch werden Resistenzgene aktiviert, deren Produkte direkt oder in Signalübertragungsketten die Erhöhung der Resistenz in der Zelle, in benachbarten Zellen und in entfernt gelegenen Bereichen der Pflanze bedingen. Zum anderen wird mit der Aktivierung von PCD-Genen der programmed cell death (PCD) eingeleitet. Dieser wird begleitet von der Akkumulation von Phenylpropanoiden, die vermutlich auch schon in früheren Stadien der HR bei deren Regulierung eine Rolle spielen. Der apoptotische Zelltod wird auch vom oxidativen burst und dem Verlust der Kompartimentierung durch Auflösen von Zell- und Zellorganellgrenzen bedingt. (Angaben nach FLOR 1956, FRASER 1990, HAMMOND-KOSACK und JONES 1996* und JABS und SLUSARENKO 2000, schematisch) (* Entlehnung graphischer Elemente mit freundlicher Genehmigung der American Society of Plant Biologists)

gibt Hinweise darauf, dass sie in die Aktivierung von Genen und in die Stimulierung des *oxidative burst* involviert ist.

Neben diesen sog. TIR-NBS-LRR-Proteinen sind eine Reihe anderer R-Gen-Produktgruppen bekannt; sie sind zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungsarbeit.

Zumeist erfüllen die *Avr*-Gene im Genom des Parasiten primär nicht die Funktion als resistenzinduzierende Faktoren; dies lässt sich allein aus ihrer Heterogenität ableiten. PFITZNER und PFITZNER (1992) gelang es, das Hüllprotein des *Tomato mosaic virus* (ToMV) als Auslöser für die HR bei Tabakpflanzen, die das Resistenzgen

N¹ tragen, nachzuweisen; in diesem Fall ist also das Hüllproteingenes das *Avr*-Gen. In der Interaktion zwischen TMV und Tabak, der das Resistenzgen N trägt, konnte dagegen die virale Replikase als Auslöser der HR bestimmt werden (FRASER 2000a). Es ist sogar möglich, dass verschiedene Domänen ein und desselben viralen Proteins als Auslöser für die HR fungieren; jeder Domäne ist ein korrespondierendes Resistenzgen zugeordnet. Dies konnten WEBER et al. (2004) am Beispiel der Wechselwirkung des 30kDa Transportproteins des *Tomato mosaic virus* mit den Resistenzgenen *Tm-2* und *Tm-2²* zeigen.

Sobald im Avirulenzgen eine Mutation auftritt, die die Tertiärstruktur des resultierenden Proteins so beeinflusst, dass eine Interaktion mit dem Rezeptor nicht mehr möglich ist, wird die HR nicht mehr ausgelöst und die Resistenz ist durchbrochen; es gibt Beispiele für das rasche Durchbrechen derartiger Resistenzen (FRASER 2000a). Die Stabilität einer Resistenz, die auf einer Gen-für-Gen-Beziehung beruht, hängt demnach stark von der Wahrscheinlichkeit von Mutationen im *Avr*-Gen ab.

Es zeigt sich, dass die Pflanze mit den R-Genen einen hochkomplexen, wirkungsvollen Mechanismus zur Pathogenerkennung und -abwehr entwickelt hat (s. Abb. 1.5–3) (HAMMOND-KOSACK und PARKER 2003). Nicht alle Fragen, die mit der Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen verbunden sind, lassen sich damit jedoch beantworten.

1.5.2 Überblick über die Hypersensibilität von *Prunus domestica* L. gegenüber PPV

KEGLER et al. (1985) berichten über unterschiedliche Resistenztypen bei der Europäischen Pflaume gegen das Scharkavirus. Dabei beschreiben sie erstmalig bei dieser Pflanzenart eine „Ausbreitungsresistenz“. Diese beobachteten sie an der aus der Kreuzung ‘Kirke’ × ‘Persikovaja’² am Moldauischen Wissenschaftlichen For-

schungsinstitut für Obstbau in Kischinjaw gezüchteten ‘Kischinever Hybride 4’, abgekürzt ‘K4’. Zunächst beobachteten sie, dass PPV-infizierte Rindenschilde, die im Rahmen von Resistenztests in Triebe von ‘K4’ veredelt wurden, abgestoßen wurden; an der Veredlungsstelle traten Nekrosen und Gummifluss auf. Diese Reaktionen erinnern stark an diejenigen der Zierkirschen-sorte ‘Shirofugen’ (*Prunus serrulata* LINDL.) nach Infektion durch Ringfleckenviren der Kirsche (*Prunus necrotic ringspot virus*) mittels *chip budding*. Oberhalb der Veredlungsstelle befindliche Triebteile von ‘K4’ starben meist ab. Wurden Edelreiser von ‘K4’ auf PPV-infizierte Unterlagen veredelt, so trieben diese zunächst aus. „Die 5 bis 7 cm langen Triebe krümmten sich jedoch an den Spitzen herab, verfärbten sich braun und starben ab [...]. Die nach Rinden- und Reispropfung aufgetretenen Reaktionen deuten auf eine Überempfindlichkeitsreaktion hin.“ Über Blattläuse konnten Pflanzen von ‘K4’ nicht mit PPV infiziert werden. Allerdings traten die geschilderten Reaktionen nicht nach Inokulation mit allen getesteten PPV-Isolaten auf. Bei einigen Isolaten erkrankte ‘K4’ systemisch und zeigte typische Scharkasymptome. Die postulierte Hypersensibilität von ‘K4’ gegenüber PPV ist also virusisolat-spezifisch. Sie tritt nach Inokulation mit Isolaten auf, die dem ‘CG’-Typ ähneln. Das Isolat ‘CG’ wird dem Stamm PPV-Rec zugerechnet. Es wurde von KEGLER in einem scharkakranken Baum der Sorte ‘Cambridge Gage’ gefunden. Es gibt jedoch auch Isolate, die zum D-Stamm gerechnet werden und HR bei ‘K4’ auslösen; es besteht also kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Stammzuordnung und auslösender Wirkung der HR (KEGLER et al. 2002).

‘K4’ wird von KEGLER et al. (1991) als „absolut resistent“ gegen die PPV-Isolate bezeichnet, die HR bedingen. Damit wollen die Autoren den prinzipiellen Unterschied zur quantitativen PPV-Resistenz hervorheben: In hypersensiblen Genotypen ist unter natürlichen Infektionsbedingungen kein Virus nachweisbar, auch nicht in geringen Konzentrationen wie in quantitativ resistenten Sorten. Der Hypersensibilität gegenüber PPV, die zugleich zur Lokalisierung des Erregers führt wie bei ‘K4’, messen KEGLER et al. (2002) eine hohe epidemiologische Bedeutung bei: Sie

2 ‘Persikovaja’ ist ein Synonym für die Pflaumensorte ‘Königin Viktoria’.

führt zu einer Verringerung der Infektionsquellen für PPV, da hypersensibel reagierende Genotypen zwar infiziert werden können, sich das Virus aber nicht systemisch verbreiten und die Pflanze damit nicht als Infektionsquelle fungieren kann.

KEGLER et al. (1991 und 2001) überprüften die Vererbung der Eigenschaft anhand einer 'K4'-Nachkommenschaft aus freier Abblüte. Ungefähr ein Drittel der Nachkommen reagierte wie die Muttersorte, ein Drittel zeigte starke Nekrosen auf den Blättern, war aber nicht in der Lage, das Virus zu lokalisieren, und ein weiteres Drittel zeigte typische Scharkasymptome. Diese Aussagen gelten nur für Isolate, die bei 'K4' eine HR auslösen.

KEGLER et al. (1991) ziehen den Schluss, dass 'K4' und 'Kirkes' als Resistenzdonoren in der Scharkaresistenzzüchtung geeignet sind. Ein entscheidender Nachteil der Nutzung der Hypersensibilität von 'K4' in der Züchtung und für den Anbau ist die Virusstammspezifität ihrer Auslösung.

HARTMANN (1997) berichtet von Hypersensibilität gegenüber PPV in Hohenheimer Hybriden der Europäischen Pflaume, die aus Kreuzungen der Sorte 'Ortenauer' mit den Sorten 'Stanley', 'Ruth Gerstetter' und 'Fellenberg' hervorgingen und gleiche Anzeichen der HR zeigen wie 'K4'. Sie unterschieden sich in der Länge des Austriebs von Edelreisern nach Pfropfung auf scharkainfizierte Bäume. Der am stärksten hypersensibel reagierende Zuchtklon 'Ortenauer × Stanley 13' wurde später unter der Sortenbezeichnung 'Jojo' in die Praxis eingeführt. Tests mit verschiedenen PPV-Isolaten zeigten, dass 'Jojo' hypersensibel gegen alle sechs Isolate reagiert, die für Inokulationsversuche verwendet wurden; diese stammten aus verschiedenen Ländern Mittel- und Osteuropas und sind teilweise dem M-, teilweise dem D-Stamm zuzuordnen (PETRUSCHKE und SCHRÖDER 1999, HARTMANN und PETRUSCHKE 2000). In langjährigen Feldtests konnte die Sorte 'Jojo' in keinem Fall über Blattläuse mit PPV infiziert werden (HARTMANN 2002).

Die hypersensible Reaktion von 'Jojo' auf PPV-Inokulation wurde von GRÜNTZIG et al.

(2001) bestätigt. Sie verwendeten andere PPV-Isolate als PETRUSCHKE und SCHRÖDER (1999). 'Jojo' reagierte auch auf Inokulation mit Stämmen, die bei 'K4' eine systemische Infektion verursachen, hypersensibel. Bis heute liegen keine Berichte über ein Durchbrechen der Resistenz durch Hypersensibilität der Sorte 'Jojo' vor.

Die Hypersensibilität gegenüber PPV im Hohenheimer Züchtungsmaterial scheint aus der Sorte 'Ortenauer' zu kommen (HARTMANN 2001). Sie ist der bislang einzig bekannte Resistenzmechanismus bei der Europäischen Pflaume, der eine absolute Resistenz der Bäume gegen PPV im Feld gewährleistet und damit den Anbau gesunder bleibender Pflanzen in Scharkabefallsregionen ermöglicht; sie verhindert zudem das Einschleppen von Scharka in Befallsgebiete durch virusinfiziertes Vermehrungsmaterial.

1.5.3 Zielstellung der Untersuchungen

Die in der Sorte 'Jojo' determinierte Hypersensibilität gegenüber PPV hat gegenüber der in 'K4' determinierten den bedeutenden Vorteil, dass sie gegen ein breites Spektrum verschiedener PPV-Isolate wirksam wird. Aus diesem Grund stellt sie für die Züchtung von Kultursorten der Europäischen Pflaume einen potentiell interessanten Donor für Scharkaresistenz dar, zumal andere bekannte Resistenzmechanismen die Vermehrung des Erregers in der Pflanze nicht in vergleichbarer Weise begrenzen können (s. Kapitel 1.4.4.3 „Bewertung der Resultate der Scharkaresistenzzüchtung“ auf S. 28). Bislang ist die Vererbung der auf Nachkommen der Sorte 'Ortenauer' zurückzuführenden Hypersensibilität nicht systematisch untersucht. Dies ist aber Voraussetzung dafür, diesen Resistenzmechanismus in der Züchtung effektiv zu nutzen. Die Züchtung resistenter Sorten wurde bereits von ATANASOFF (1935) als bestgeeigneter Weg zur Vermeidung von Schäden durch das Scharkavirus erkannt.

Auch der Nachweis, dass es sich bei den beschriebenen Symptomen tatsächlich um eine hypersensible Reaktion der Pflanze auf den Erregerbefall handelt, ist bislang nicht erbracht; KEGLER et al. (2001) und HARTMANN (2002) stützen ihre Aussagen lediglich auf visuell fassbare Ab-

sterbeerscheinungen nach massiver Inokulation mit PPV. Der Nachweis von für die HR charakteristischen stoffwechselphysiologischen Indikatoren (s. Kapitel 1.5.1 „Die pflanzliche Hypersensibilitätsreaktion“ auf S. 32) steht bisher aus.

Die vorliegende Arbeit soll Antwort auf folgende Fragen geben:

- 1** Welche Ausprägungsformen der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV gibt es?
- 2** Welche Veränderungen im Blattgewebe hypersensibler Genotypen treten nach einer Infektion mit PPV auf? Handelt es sich dabei um eine hypersensible Reaktion? Kann die Pflanze damit die Ausbreitung des Virus verhindern?
- 3** Können hypersensible Genotypen effektiv in der Züchtung auf Scharkaresistenz eingesetzt werden?
- 4** Wie können molekulare Marker entwickelt werden, mit deren Hilfe auf PPV-Infektion hypersensibel reagierende Genotypen in Kreuzungsnachkommenschaften zuverlässig selektiert werden können?

Anhand dieser Fragestellungen soll abgeschätzt werden, welches Potential die Nutzung der Resistenz durch Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV für die Züchtung und den Anbau hat.

2 Ausprägungsformen der Hypersensibilität gegenüber PPV

Die Ausprägung der Hypersensibilität der Sorte 'Jojo' gegenüber PPV wurde von HARTMANN (1997) und PETRUSCHKE und SCHRÖDER (1999) detailliert beschrieben. HARTMANN (2001) verweist auf ein umfangreiches Kreuzungsprogramm an der Universität Hohenheim mit dem Ziel, die Hypersensibilität der Sorte 'Jojo' (= 'Ort×Stan13') und des aus der gleichen Kreuzungskombination hervorgegangenen Zuchtklons 'Ort×Stan34' in Genotypen der Europäischen Pflaume mit verschiedenen Reifezeiten und Verwertungseigenschaften zu übertragen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Ausprägungsformen der Hypersensi-

bilität gegenüber PPV in Nachkommenschaften ausgewählter Zuchtpopulationen aus dem genannten Züchtungsprogramm zu untersuchen und so die Variabilität des Merkmals zu erfassen. Dies bildet die Voraussetzung für die Untersuchungen sowohl zur Auswirkung der HR auf die Interaktion zwischen PPV und Pflanze als auch zur Vererbung des Merkmals.

Darüberhinaus sollte die Bedeutung der Inokulationsmethode und des verwendeten Virusisolats als mögliche Einflussfaktoren auf die Ausprägung der Hypersensibilität überprüft werden.

2.1 Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften

Bislang liegen Beschreibungen über die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV nur von wenigen Genotypen vor (s. Kapitel 1.5.2 „Überblick über die Hypersensibilität von *Prunus domestica* L. gegenüber PPV“ auf S. 37). Um die gesamte Bandbreite möglicher Ausprägungsformen zu erfassen, wurden Nachkommen verschiedener Kreuzungskombinationen mit jeweils mindestens einem hypersensiblen Elternteil auf diese Eigenschaft hin untersucht.

Material und Methoden

Doppelveredlungen im Gewächshaus. Die zu testenden Genotypen wurden im Januar 2003 bzw. 2004 in Anlehnung an die von KEGLER et al. (1994) beschriebene Methode auf virusfreie Sämlinge der Myrobalane (*Prunus cerasifera* ERH.) mit einem scharkainfizierten Edelreis als Zwischenveredlung gepfropft. Dazu wurde eine Veredlungsmaschine (Modell Topgrafter der Firma Raggett Industries, Neuseeland) verwendet. Reiser für die Zwischenveredlung wurden von seit Jahren mit PPV-D infizierten Bäumen aus Scharkaversuchsanlagen in Weil der Stadt, Breisach und Ortenberg gewonnen, deren starker Befall durch mehrjährige Bonituren im Vorfeld der Reisernahme gesichert war. (Für Untersuchungen mit anderen Virusisolaten sei auf Kapitel 2.2.2 auf S. 58 verwiesen.) Es fanden Reiser folgender Sorten Verwendung: ‘Auerbacher’, ‘Cacaks Fruchtbare’, ‘Cacaks Frühe’, ‘Cacaks Schöne’, ‘Elena’, ‘Hanita’, ‘Hauszwetsche, Typ Wolff’, ‘Hoh 1061’, ‘Hoh 1022’, ‘Katinka’, ‘Pitestean’, ‘Tegera’ und ‘Valjevka’. Für sämtliche Nachkommen einer Kreuzungskombination wurden Reiser der gleichen Zwischenveredlungsorte verwendet. Die Edelreiser der zu testenden Genotypen wurden im Dezember im Züchtungsquartier der Universität Hohenheim geschnitten und bis zur Veredlung in einer Kühlzelle bei 4°C gelagert. Je Genotyp wurden drei Doppelveredlungen angefertigt. Insgesamt wurden 1167 verschiedene Genotypen in je drei Wiederholungen untersucht (s. Tab. 2.1–1).

Tab. 2.1–1 Auf Hypersensibilität untersuchte Kreuzungsnachkommenschaften mit der jeweiligen Anzahl der getesteten Hybriden. Hypersensible Genotypen sind durch Farbdruck hervorgehoben.

Kreuzungskombination	Zwischenveredlung	Anzahl
Hoh 4465 × Jojo	Hoh 1061	58
Hoh 4515 × Jojo	Elena	63
Cacaks Beste × (Ort×Stan 34) ^a	C. Fruchtbare	14
Cacaks Fruchtbare × (Ort×Stan 34)	Katinka	30
Cacaks Schöne × (Ort×Stan 34)	C. Schöne	9
Elena × (Ort×Stan 34)	Hauszwetsche	63
Fellenberg × Jojo	Elena	20
Hanita × Jojo	Hanita	52
Jojo × Haganta	Hanita	7
Jojo × Hoh 1468	C. Frühe	70
Jojo × Hoh 4465	C. Schöne	14
Jojo × Cacaks Fruchtbare	Auerbacher	62
Jojo × Fellenberg	Hoh 1022	76
Jojo × Felsina	Hoh 1022	91
Jojo × Hanita	Pitestan	49
Jojo × Hauszwetsche, Typ Gunser	Hanita	20
Jojo × Hauszwetsche, Typ Schüfer	Auerbacher	31
Jojo × Jojo	Tegera	33
Jojo × Katinka	Valjevka	51
Jojo × Klon 108	Tegera	68
Jojo × Klon 128	Tegera	43
Jojo × (Ort×Gerst 17) ^b	Hanita	14
Jojo × Presenta	Katinka	77
Jojo × Zwitschers Frühe	Katinka	47
(Ort×Stan 34) × Hanita	C. Fruchtbare	43
(Ort×Stan 34) × Jojo	Katinka	47
Anzahl der geprüften Elternsorten der Kreuzungskombinationen und sonstigen Genotypen aus dem Zuchtquartier		15
Summe		1167

a ‘Ort×Stan 34’ ist der Hohenheimer Zuchtklon Nr. 34 aus der Kreuzungskombination ‘Ortenauer’ × ‘Stanley’.

b ‘Ort×Gerst 17’ ist der Hohenheimer Zuchtklon Nr. 17 aus der Kreuzungskombination ‘Ortenauer’ × ‘Ruth Gerstetter’.

Kulturmaßnahmen. Nach der Veredlung wurden die Pflanzen – entsprechend dem Arbeitsablauf – drei bis zwanzig Tage in der Kühlzelle bei 4°C gelagert. Anfang Februar 2003 bzw. 2004 wurden sie in Rosentöpfe mit einem Fassungsvermögen von 3 Litern in Torf-Ton-Substrat (Hawita Ton-Substrat 2) getopft und in einem beheizbaren Foliengewächshaus der Versuchstation für Gartenbau der Universität Hohenheim aufgestellt (Temperaturregime: $T_{\text{maximal Tag}}$: 10°C, Lüftung ab 15°C, $T_{\text{minimal Nacht}}$: 10°C; nach zwei Wochen: $T_{\text{maximal Tag}}$: 15°C, Lüftung ab 19°C, $T_{\text{minimal Nacht}}$: 10°C; Tag von 8 bis 22 Uhr). Frostspanner, Blattläuse, Rostmilben und Mehltau wurden mit handelsüblichen Pflanzenschutzmitteln bekämpft. Nährionen wurden bei Bedarf dem Gießwasser zugesetzt (Flory 3 und Kalkammonsalpeter, EC-Wert 2,9 mS/cm).

Unterlagenaustriebe wurden laufend entfernt. Austriebe der Zwischenveredlung wurden dekapitiert, nachdem sich an den Sprossen drei Blätter entwickelt hatten. Die Austriebe der Edelreiser der zu testenden Genotypen wurden dem natürlichen Wuchs überlassen.

Bonituren. Sämtliche Pflanzen wurden 10 und 13 Wochen nach dem Topfen hinsichtlich ihrer Reaktion auf PPV-Inokulation durch Doppelpfropfung bonitiert. In Tab. 2.1–2 sind die bonitierten Merkmale, deren Ausprägungsformen und die zugeordneten Boniturstufen aufgeführt. Die Boniturstufen liegen stets zwischen 0 als Minimalwert und – abhängig vom Merkmal – 1, 3 bzw. 5 als Maximalwert. Lediglich bei der Länge des Triebes nach Triebspitzendürre beginnt die Boniturskala erst beim Wert 1, da ein Wert von 0 „kein Austrieb“ bedeutete, was eine Bewertung der anderen Merkmale ausschloß. Bewertet wurden nur Sorten-Unterlagen-Kombinationen, die gut verwachsen waren und an denen die Blätter der sich an der Zwischenveredlung bildenden Sprosse deutliche Scharkasymptome zeigten.

Virusnachweis. Neben den visuellen Tests wurde in Einzelfällen (so bei undeutlich ausgeprägten Symptomen und bei scharkasymptomfreiem Neuaustrieb von Edelreiser nach Triebspitzendürre (s. u.)) mit *Immunocapture*-RT-PCR (IC-RT-PCR) und *Double Antibody Sandwich* ELISA

(DAS-ELISA) auf Anwesenheit von PPV im pflanzlichen Gewebe getestet. Die IC-RT-PCR wurde mit der von WETZEL et al. (1992) beschriebenen Methode durchgeführt. Verwendet wurde folgendes Primerpaar, mit dem PPV nichtstammspezifisch nachgewiesen werden kann:

- 5'-ACCGAGACCACTACTCCC-3'
- 5'-CAGACTACAGCCTCGCCAGA-3'

Serologisch wurde PPV mit dem DAS-ELISA nachgewiesen. Die Methode basiert auf Angaben von CLARK und ADAMS (1977) und ist detailliert beschrieben in den Nachweismethoden für Quarantäneschaderreger der European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO 2004).

Histologische Untersuchungen. Um die Entwicklung scharkavirusbedingter Rindennekrosen näher zu charakterisieren, wurden mikroskopische Schnitte durch Sprosse angefertigt und gefärbt. Je vier Sprosse pro Rindennekrosenboniturstufe wurden von verschiedenen Genotypen, ohne deren Zugehörigkeit zu bestimmten Kreuzungspopulationen zu berücksichtigen, entnommen und sofort in glutaraldehyd- und formaldehydhaltigen Phosphatpuffer (pH 7,3) als Fixierlösung (KARNOVSKY 1965) überführt. Im Spross vorhandene Lufteinschlüsse wurden entfernt, indem diese durch Anlegen von Unterdruck (bis 15 mbar) durch Fixierlösung ersetzt wurden. Unterdruck wurde so lange angelegt, bis keine Luftblasen aus dem pflanzlichen Gewebe mehr entwichen. Fixiert wurde bei 4°C für mindestens 24 Stunden. Anschließend wurden die Objekte in aufsteigender Ethanolreihe (20/40/60/80/90/96 Vol.-%, jeweils eine Stunde pro Ethanolstufe) entwässert.

Die dehydrierten Proben wurden in Kunstharz eingebettet. Hierzu wurden sie 24 Stunden in einem Gemisch aus Glycolmethacrylat und Methylmethacrylat¹ (1:1) unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend nach der von RUDDELL (1967 a, b) entwickelten und von HERMANN

1 Glycolmethacrylat (GMA) = (2-Hydroxyethyl)-methacrylat, Methylmethacrylat (MMA) = Methacrylsäuremethylester

Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV

Tab. 2.1-2 Bonitierte Merkmale und deren Ausprägungsformen (TSD=Triebspitzendürre, ZV=Zwischenveredlung)

Veredlungsbestandteil	Merkmal	Merkmalsausprägung	Boniturwert
Zwischenveredlung	Stärke des Austriebs	kein Austrieb	0
		schwach	1
		mittelstark	2
		stark	3
	Scharkasymptome auf der Blattspreite	ohne	0
		sehr geringe	1
		geringe	2
		mittelstarke	3
		starke	4
zu testender Genotyp („Edelsorte“)	Rindennekrosen am Spross (Austrieb)	ohne	0
		einige nekrotische Flecke	1
		nekrotische Flecke	2
		längliche nekrotische Streifen	3
		über mehrere Nodien reichende nekrotische Streifen	4
	von der Basis bis zur Spitze reichende nekrotische Streifen	5	
	Nekrosen der Blattspreite	ohne	0
		einzelne nekrotische Flecke nahe bei den Blattadern	1
		einzelne nekrotische Flecke über die Spreite verteilt	2
		große nekrotische Flecke	3
		ineinanderlaufende nekrotische Bereiche	4
	Spreite fast vollständig nekrotisch	5	
	Schrotschusssymptom	ohne	0
		mit	1
	TSD am kränksten Trieb	ohne	0
		beginnende Welke	1
		Welke	2
		Welke, erste Blätter trocknen ein	3
		einige Gewebebereiche des Sprosses noch grün	4
	Spross vollständig eingetrocknet	5	
Länge des Triebes mit stärkster TSD	nach längerer Wachstumsphase abgestorben	1	
	länger als ZV-Austrieb	2	
	etwa so lange wie ZV-Austrieb	3	
	kürzer als ZV-Austrieb	4	
	unmittelbar nach dem Austrieb abgestorben (<3 cm)	5	
TSD am gesündesten Trieb	ohne	0	
	beginnende Welke	1	
	Welke	2	
	Welke, erste Blätter trocknen ein	3	
	einige Gewebebereiche des Sprosses noch grün	4	
Spross vollständig eingetrocknet	5		
Länge des Triebes mit geringster TSD	nach längerer Wachstumsphase abgestorben	1	
	länger als ZV-Austrieb	2	
	etwa so lange wie ZV-Austrieb	3	
	kürzer als ZV-Austrieb	4	
	unmittelbar nach dem Austrieb abgestorben (<3 cm)	5	
Neuaustrieb nach TSD	ohne Neuaustrieb	0	
	mit Neuaustrieb	1	
Scharkasymptome auf der Blattspreite	ohne	0	
	sehr geringe	1	
	geringe	2	
	mittelstarke	3	
	starke	4	
sehr starke	5		
Oberfläche der Blattspreite	genotyptypisch glatt	0	
	einseitig leicht gewellt	1	
	ganze Spreite leicht gewellt	2	
	gewellt	3	
	stark gewellt	4	
gekräuselt	5		

und SCHULZ (1981) modifizierten Methode eingebettet. Als Monomere des Kunstharzes wurden die beiden oben genannten Substanzen verwendet, als Beschleuniger des Polymerisationsprozesses Benzoylperoxid und N,N-Dimethylanilin sowie als Weichmacher Polyethylenglycol 400 und Ethenglycolmonobuthylether (Buthylglycol). Die Polymerisation erfolgte in Polyethylenmulden. Alle Schritte (bis auf die Überführung der Objekte in die Mulden) wurden bei 4°C ausgeführt. Nach einer Polymerisationszeit von 48 Stunden wurden die Kunstharzblöcke aus den Mulden entnommen.

Mit Hartmetallmessern wurden mit dem Mikrotom Supercut 2050 (Reichert-Jung) Semidünnschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf Objektträger überführt. Anschließend wurden die Objekte für 12 Stunden bei 40°C getrocknet.

Die Schnitte wurden in Astrablau-Chrysoidin-Neufuchsin (ACN)-Lösung wie folgt gefärbt (nach ETZOLD 2002, modifiziert): 0,5g Astrablau (Merck) wurde in 100ml angesäuertem Wasser (97,5ml destilliertem Wasser mit 2,5ml Essigsäure) gelöst, ebenso 1g Chrysoidin (Chroma) und 0,1g Neufuchsin (Merck) in jeweils 100ml destilliertem Wasser. Die separaten Lösungen wurden im Verhältnis Astrablau:Chrysoidin:Neufuchsin = 20:1:1 gemischt. In dieser ACN-Färbelösung wurden die Objektträger mit den Semidünnschnitten 5 bis 10 min inkubiert und danach ebensolange in Leitungswasser differenziert. Die Objekte wurden bei 40°C getrocknet und mit Eukitt als Einschlussmittel zu Dauerpräparaten weiterverarbeitet. Die Präparate wurden mit einem Mikroskop des Typs Axiophot (Zeiss) mit Plan-Apochromat-Objektiven (Zeiss) untersucht. Verholzte Zellwände wurden mit ACN-Lösung rot, unverholzte intensiv blau und lipophile Cutin- und Suberinstrukturen gelb-orange gefärbt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Edelreiser begannen etwa sechs Wochen nach dem Aufstellen im Foliengewächshaus auszutreiben. Anfänglich traten zwischen den Genotypen keinerlei Unterschiede auf. Nachdem die Sprosse eine Länge von ca. 3cm erreicht hatten, zeigten sich erste Abweichungen zwischen den

unterschiedlichen Genotypen. Innerhalb der Wiederholungen reagierten die Pflanzen gleichförmig (s. Abb. 2.2–1 A auf S. 57).

Triebspitzendürre. Zehn Tage nach dem Austrieb färbten sich die Sprossspitzen bei einigen Genotypen olivgrün, teilweise zusätzlich leicht rot. Die Blätter an der Triebspitze zeigten Welkeerscheinungen, häufig krümmte sich die Terminale bogenförmig nach unten. Innerhalb weniger Tage nekrotisierte die gesamte Triebspitze, schließlich starb der gesamte Spross ab (Triebspitzendürre). In Einzelfällen bildeten sich am Edelreis an der Basis der verdorrten Sprosse neue Knospen, die nachfolgend austrieben. Derart reagierten die Hybriden 'Hoh 5913', 'Hoh 5925', 'Hoh 5951', 'Hoh 6087', 'Hoh 5265', 'Hoh 5331', 'Hoh 4648', 'Hoh 5944' und 'Hoh 6570'. Die sich aus den Knospen entwickelnden Triebe starben teilweise sehr rasch nach dem Austrieb ab, zum Teil aber erst nach mehreren Monaten, teilweise erst nach einer Dormanzphase (Winterruhe). Solange diese Neuaustriebe keine Triebspitzendürre zeigten, konnte das Virus darin weder mittels IC-PCR noch mittels DAS-ELISA im pflanzlichen Gewebe nachgewiesen werden.

Symptome der Triebspitzendürre traten bei vielen Genotypen nicht unmittelbar nach dem Austrieb, sondern erst einige Wochen danach bei einer Sprosslänge zwischen 5 und 30 cm, vereinzelt bei noch längeren Sprossen auf. Bei einigen Genotypen starb nur die Triebspitze ab; die Triebbasis wies in diesen Fällen meist starke Rindennekrosen auf. Vereinzelt welkte die Triebspitze, und einige Blätter nahe der Terminale starben ab, die Triebspitze trieb aber erneut durch. Die meisten der derart reagierenden Pflanzen zeigten starke Blattspreitennekrosen.

Sowohl im Hinblick auf den Zeitpunkt des Einsetzens als auch hinsichtlich der Intensität der Triebspitzendürre gab es zwischen den Genotypen große Unterschiede. In Abb. 2.1–1 und Abb. 2.1–2 sind exemplarisch Ausprägungsformen der Triebspitzendürre dargestellt.

Rindennekrosen am Spross. Bei einigen Genotypen traten am primären Abschlussgewebe der sich bildenden Sprossachsen Nekrosen auf. Diese wurden zunächst als feine, braun-schwarze Lini-

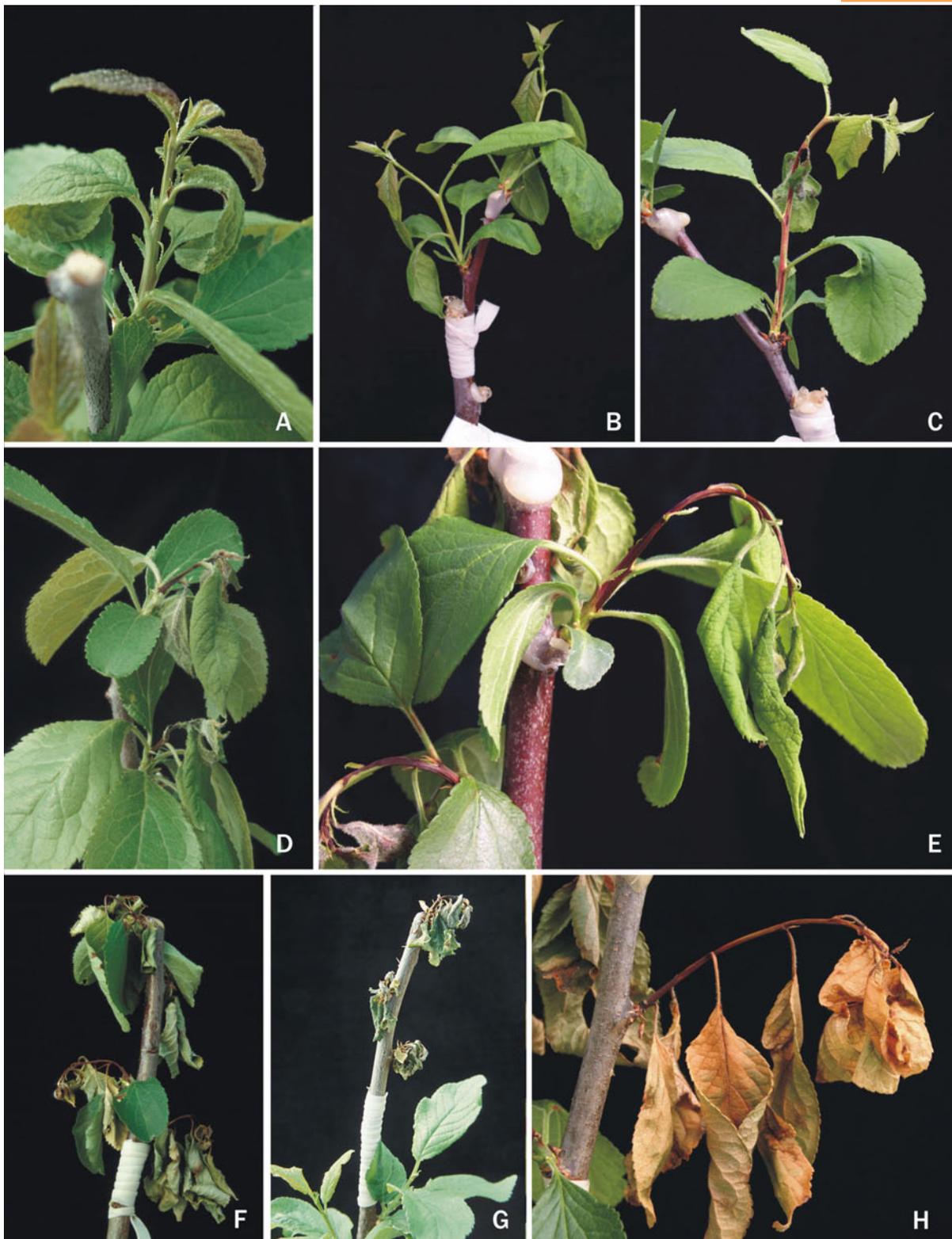


Abb. 2.1-1 Entwicklung der Triebspitzendürre bei hypersensiblen Genotypen nach Doppelpfropfung mit PPV-infizierter Zwischenveredlung. **A** Junge Blätter färben sich olivgrün und rötlich ('Hoh 7460', Boniturstufe 1). **B** Triebspitze beginnt zu welken ('Hoh 7460', Boniturstufe 2). **C** Triebspitze krümmt sich hakenförmig. Häufig bilden sich starke Rindennekrosen. ('Hoh 5944', Boniturstufe 3). **D/E/F** Von der Triebspitze her stirbt der Neuaustrieb ab ('Hoh 6372', Boniturstufe 4). **G/H** Die Sprosse sind vollständig abgestorben ('Hoh 7342', Boniturstufe 5).

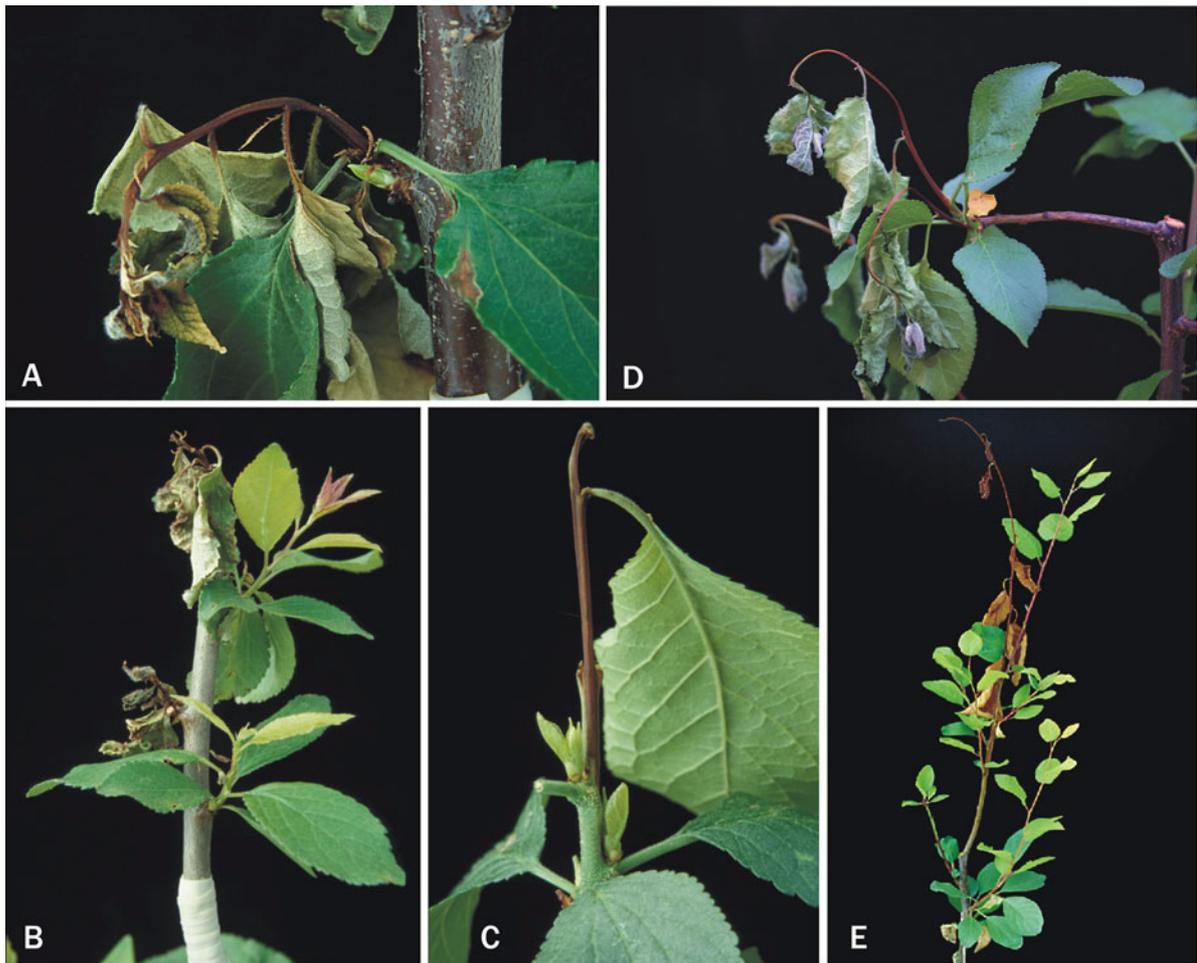


Abb. 2.1–2 Besonderheiten bei der Entwicklung der Triebspitzendürre hypersensibler Genotypen nach Doppelpfropfung mit PPV-infizierter Zwischenveredlung. **A** Nach dem Absterben sämtlicher Neuaustriebe am Edelreis bildet sich an der Triebbasis eine neue Knospe, welche austreibt ('Hoh 6372'). **B** Die daraus hervorgehenden Triebe sind frei von Symptomen, meist kann kein Virus darin nachgewiesen werden ('Hoh 6372'). **C** Die gleiche Entwicklung kann auch durch unvollständiges Absterben des Triebes und Neuaustrieb aus Blattachselknospen erfolgen ('Hoh 6029'). **D/E** Nach mehreren Monaten ungestörten Wachstums (D) oder einer Dormanzphase (E) zeigen zunächst einige Zweige Triebspitzendürre, später stirbt das gesamte aufveredelte Reis ab ('Hoh 5971').

en sichtbar, die senkrecht zum Sprossquerschnitt verliefen. Diese weiteten sich schließlich aus, miteinander reichten sie von der Triebbasis bis zur Triebspitze. Infolge gestörten Wachstums krümmte sich die Triebspitze in Richtung der Seite, auf der die Sprossachse nekrotisierte. Diese Verkrümmung ist nicht mit der bei Triebspitzendürre auftretenden gleichzusetzen, welche oft eine reine Welkeerscheinung ist. Blätter, deren Ansatzpunkte am Spross sich im Bereich der Nekrosen befanden, starben ab. Die Nekrosen blieben teilweise fadendünn, teilweise umfassten sie schließlich die gesamte Sprossachse, was zum Absterben des terminal darüber liegenden Teils

des Sprosses führte. Bisweilen trat am Rand der Nekrosen Gummifluss auf.

In einigen Fällen zeigten sich Nekrosen erst nach dem Verholzen des Triebes. Im Periderm bildeten sich feine bis grobe Risse und miteinander bis tief ins Xylem reichende Spalten. Bei milderem Verlauf der Symptomausprägung wurde das Periderm triebumgreifend schuppenartig abgestoßen (s. Abb. 2.1–3).

Ausgangspunkt für die Nekrosen waren das Kambium und angrenzende Bereiche, wie histologische Schnitte durch den Spross zeigen. Entlang des kambialen Rings starben weitere Zel-

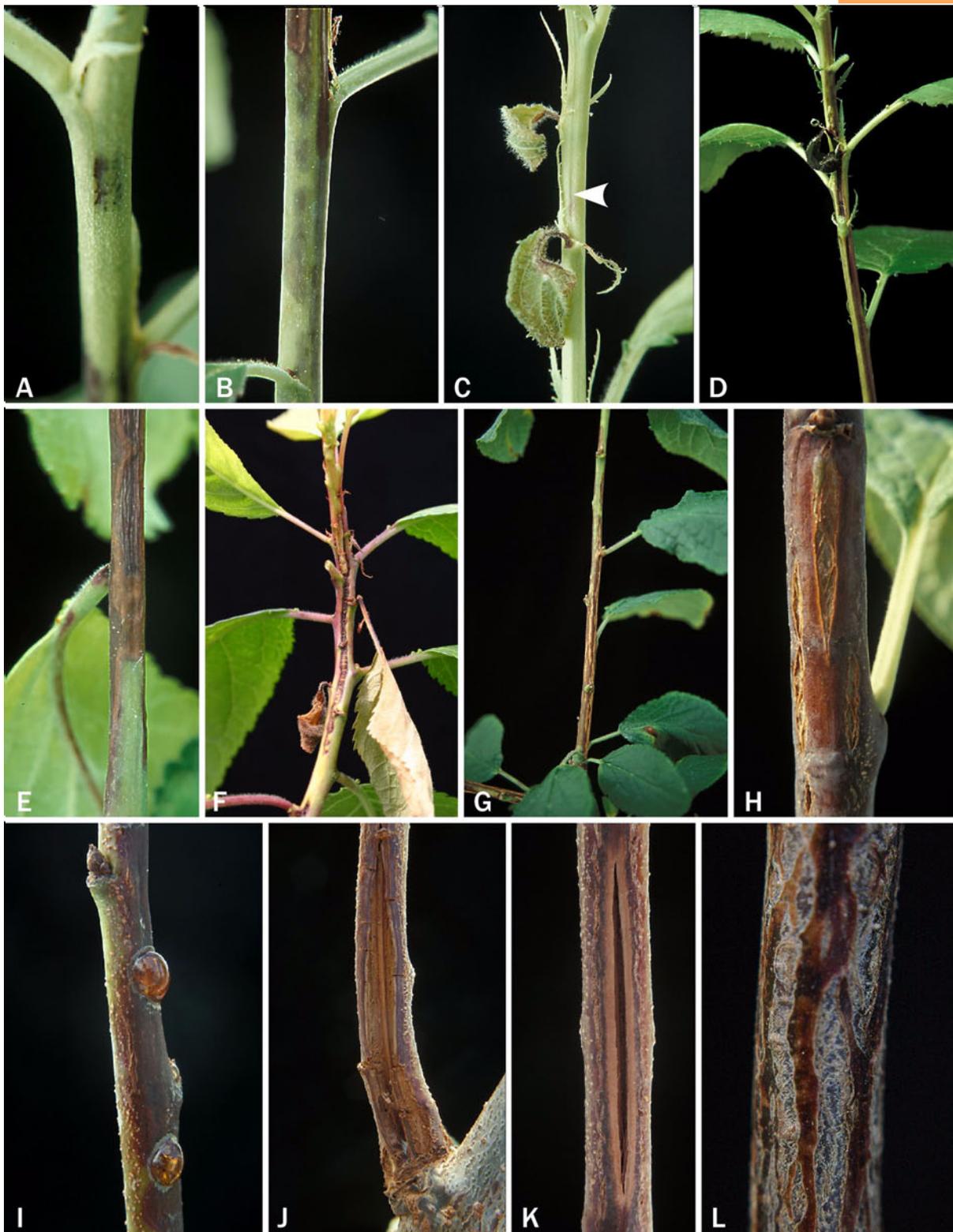


Abb. 2.1–3 Ausprägungsformen von Rindennekrosen. **A** Rindennekrose im frühen Stadium ('Hoh 6022', Boniturstufe 1). **B** Wie A, fünf Tage später (Boniturstufe 2). **C** dünne, linienförmige Nekrose (Pfeil). Blätter mit Ansatzpunkt im nekrotischen Bereich sterben ab ('Hoh 5944', Boniturstufe 3). **D/E/F** Rindennekrosen bei 'Hoh 5942', 'Hoh 6019' und 'Hoh 7117' (Boniturstufe 4). **G** Das äußere Abschlussgewebe am einjährigen Spross wird schuppenförmig abgestoßen ('Hoh 6512', Boniturstufe 4). **H/I/J/K/L** Rindennekrosen verschiedener Ausprägungen (Erläuterungen s. Text) ('Hoh 5016', 'Hoh 5920' (mit Gummifluss), 'Hoh 5942' (J/K, mit bis ins Xylem reichenden Spalten) und 'Hoh 6999' (mit abblätterndem Periderm)).

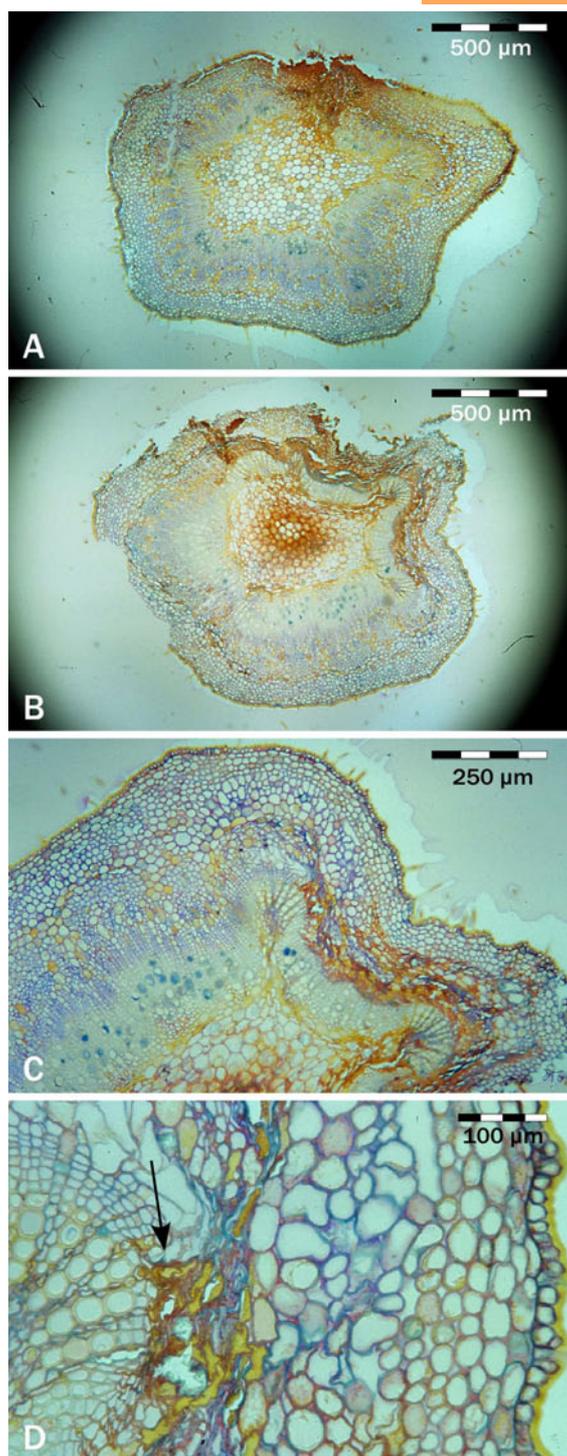


Abb. 2.1–4 Querschnitt durch einen Spross mit Rindennekrosen ('Hoh 7355'). Abgestorbene Zellen sind gelb-orange gefärbt (ACN-Färbung). **A** Anfangsstadium. **B** Fünf Tage später: Der nekrotische Gewebebereich ist vergrößert, halbseitig bricht das Gewebe am Spross zusammen. **C** Übergangsbereich zwischen gesundem und abgestorbenem Gewebe. **D** Ausgangspunkt der Nekrosen sind Zellen des Kambiums (Pfeil) und benachbarte Zellen.

len ab, nachfolgend auch Zellen des Phloems und der Epidermis. Selbst Xylemgefäße kollabierten schließlich. In einigen Fällen umfasste die Nekrose schließlich den gesamten Spross. In Abb. 2.1–4 sind Querschnitte durch einen Spross mit Rindennekrosen dargestellt.

Nekrosen der Blattspreite. Bei vielen Genotypen zeigten sich auf der Blattspreite Nekrosen. Oft entstanden diese so schnell, dass kaum eine chlorotische Phase vorgeschaltet war. Die Nekrosen entstanden stets entlang von Blattadern höherer oder niedriger Ordnung, fast nie nahmen sie in Interkostalfeldern ihren Anfang.

Teilweise bedeckten die Flächen, die nekrotisierten, nur einen geringen Teil der Blattspreite. Die Nekrosen waren in diesem Fall punktförmig oder streifenförmig, nur selten fanden sich beide Typen an einem Genotyp. Vereinzelt ging der Nekrotisierung eine auffallende Rotfärbung der entsprechenden Gewebebereiche voraus.

Die Mehrzahl der Genotypen, die Nekrosen entwickelten, zeigten diese als unregelmäßige Flecke auf der Blattspreite, die sich aufgrund des großflächigen Gewebezusammenbruchs auffallend kräuselte. Mitunter breiteten sich die nekrotisierenden Flächen mit zunehmendem Blattalter weiter aus, so dass sich einzelne Flecke zu zusammenhängenden großen Flächen abgestorbenen Gewebes verbanden. Derartige Blätter wurden vorzeitig abgestoßen.

Scharkasymptome auf der Blattspreite. Einige Genotypen bildeten typische Scharkasymptome auf der Blattspreite aus (s. Kapitel 1.3.2.2 „Symptome“ auf S. 10). Vereinzelt wurden die typischen, hellgrün gefärbten Flecke stark chlorotisch und bedeckten mehr als zwei Drittel der Blattspreitenoberfläche (s. Abb. 2.1–6F).

Veränderungen im Wuchsverhalten. Hinsichtlich des vegetativen Wachstums ließen sich zwei Grundtypen unterscheiden (s. Abb. 2.1–7):

- 1 Die Stärke des Triebwachstums und der Habitus waren nicht beeinträchtigt. Vor allem Genotypen, die mit typischen Scharkasymptomen auf der Blattspreite (sämtliche Boniturstufen) und leichten Blatt- und Rindennekrosen (Boniturstu-

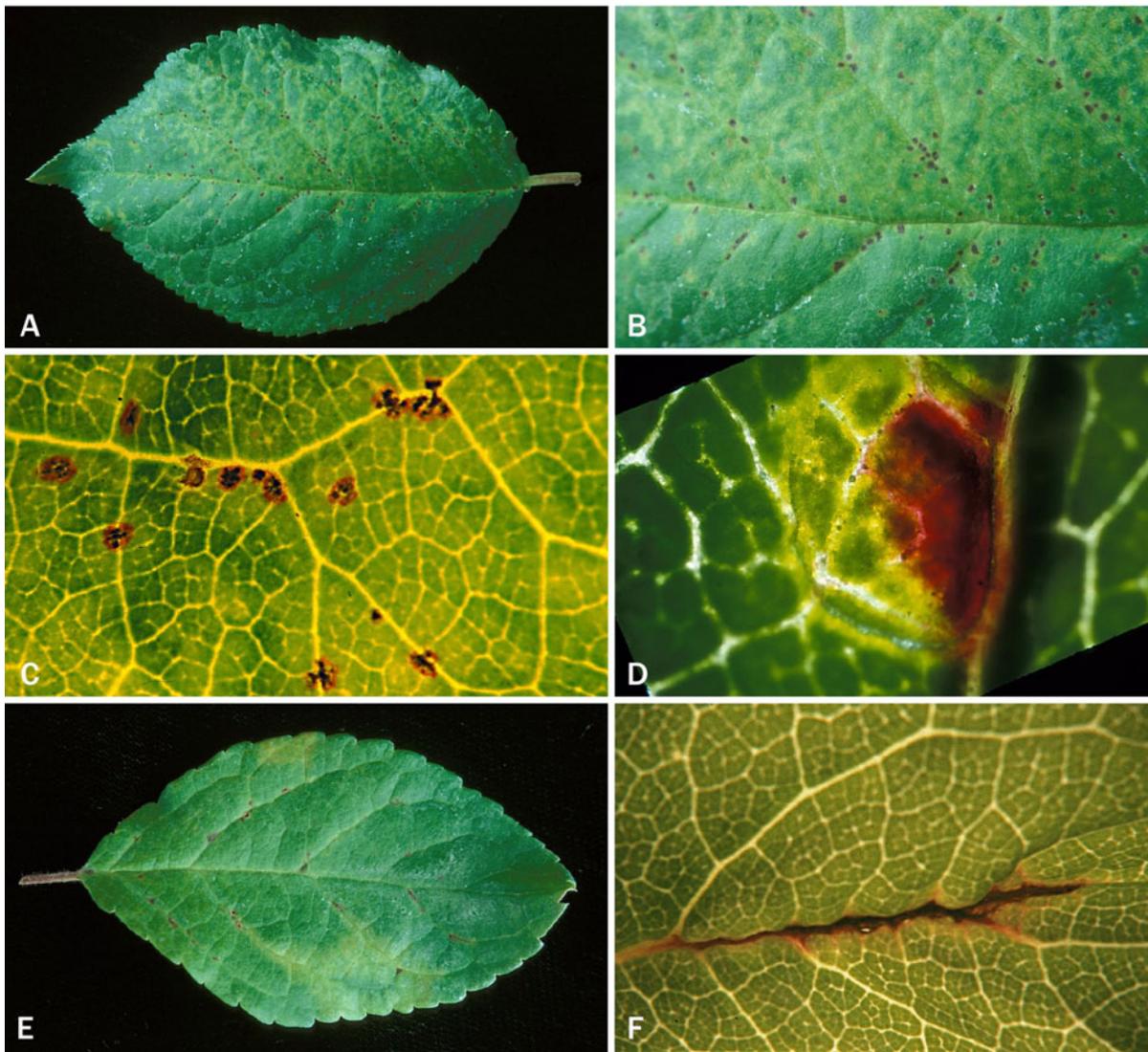


Abb. 2.1–5 Beispiele für schwache Blattspreitennekrosen (Boniturstufe 1). Die Nekrosen entstehen stets nahe der Blattadern. Sie sind scharf vom gesunden Gewebe abgegrenzt. **A/B/C/D** punktförmige Nekrosen ('Hoh 5306'). **E/F** streifenförmige Nekrosen ('Hoh 5310').

fen 1 und 2) reagierten, bildeten diese Gruppe.

- 2 Das Triebwachstum war reduziert, die Sprossachsen waren gestaucht. Derartig reagierten vor allem Genotypen mit mittleren und starken Blattspreiten- und Rindennekrosen (Boniturstufen 3–5).

Hypersensibilität als quantitatives Merkmal.

Die Variabilität des Merkmals Hypersensibilität gegenüber PPV zwischen verschiedenen Genotypen ist sehr hoch. In jeder der untersuchten Nachkommenschaften konnten einerseits Hybriden gefunden werden, die typische Scharkasym-

ptome ausprägten ohne jeden Hinweis auf das Vorliegen von Hypersensibilität, andererseits aber auch Hybriden, die eindeutige Anzeichen von Hypersensibilität zeigten. Dazwischenliegend gab es eine große Gruppe von Genotypen, die Nekrosen an Blättern oder Sprossen entwickelten, aber nicht mit Triebspitzendürre reagierten.

KEGLER et al. (1991) berichten, dass auch in einer Nachkommenschaft, die aus freier Abblüte der gegenüber bestimmten PPV-Isolaten hypersensibel reagierenden Sorte 'K4' entstanden war, Genotypen mit unterschiedlicher Ausprägung der Hypersensibilität vorkamen. Sie teilten



Abb. 2.1–6 Ausprägungsformen der Blattspreitennekrosen. **A/B** Starke Blattspreitennekrosen führen zum Abwerfen der betroffenen Blätter ('Hoh 6742' und 'Hoh 7412'). **C** Boniturstufe 3 ('Hoh 7199') **D** Boniturstufe 5 ('Hoh 6744') **E** Die Form der Blattspreitennekrosen auf einem Blatt kann variieren ('Hoh 6789'). **F** Extrem stark ausgeprägte Chlorosen bei 'Hoh 5355', Nekrosen fehlen. **G** Um die scharkatypischen chlorotischen Flecke bilden sich Nekrosen (Boniturstufe 2, 'Hoh 7399'). **H** Einzelne Nekrosen auf der Blattspreite von 'Hoh 7558' (Boniturstufe 1). **I** Blattspreite großflächig nekrotisch (Boniturstufe 5, 'Hoh 7409').

die Genotypen phänotypisch allerdings nur in zwei Gruppen ein: in Genotypen mit arttypischen Scharkasymptomen beziehungsweise mit nekrotischen Reaktionen. Die im vorliegenden Versuch erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass bei Nachkommen der Sorte 'Jojo' und des Geschwisterzuchtklons 'Ort×Stan34' eine stärkere Aufspaltung im Hinblick auf das Merkmal Hypersensibilität vorliegt, die die Bildung von vier Gruppen (Hypersensibilitätsklassen (HK)) rechtfertigt:

1 Genotypen ohne Anzeichen von Hypersensibilität (HK 0)

Diese bilden in aller Regel Scharkasymptome auf der Blattspreite aus. In den wenigen Fällen, in denen keine Symptome ausgeprägt wurden, konnte zumindest mittels IC-PCR PPV im pflanzlichen Gewebe nachgewiesen werden. Somit konnte bei keinem der 1167 untersuchten Genotypen Immunität nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit der von HARTMANN und PETRUSCHKE (2000) sowie GRÜNTZIG et al. (2001) formulierten

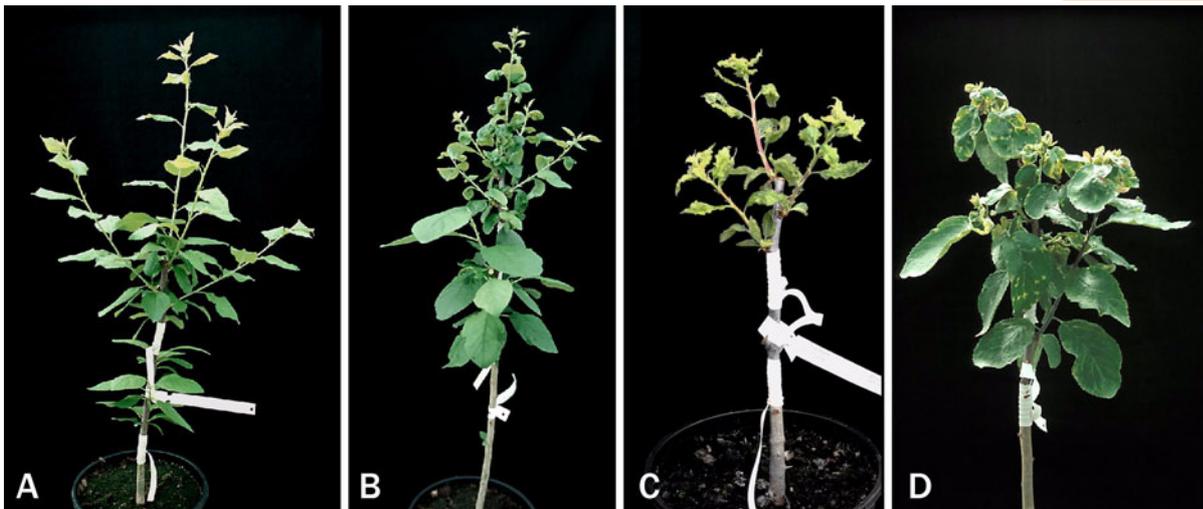


Abb. 2.1–7 Veränderungen im Wuchsverhalten. **A** Bei 'Hoh 7101' ist nach PPV-Inokulation durch Doppelveredlung keine Beeinträchtigung des Wuchsverhaltens festzustellen. **B** 'Hoh 7084' reagiert mit einer Stauchung der Sprossachse, die Blattspreiten sind gekräuselt. **C** 'Hoh 6241' zeigt ebenfalls verkürztes Längswachstum, die Blattspreite ist stark gezahnt, schmal und spitz. **D** Bei 'Hoh 7347' ist die Sprossachse sehr stark verkürzt, die Internodien sind nur wenige Millimeter lang.

Vermutung, dass bei der Europäischen Pflaume keine PPV-immunen Formen existieren.

2 Genotypen mit schwach ausgeprägter Hypersensibilität (HK 1)

Hierzu zählen Hybriden, die mit Blattspreiten- und/oder leichten Rindennekrosen auf massive PPV-Inokulation reagieren. Meist prägen sie zusätzlich typische Scharkasymptome auf der Blattspreite aus. Triebspitzendürre tritt bei Genotypen dieser Gruppe nicht auf. Die Blattspreite ist oftmals gekräuselt und der Habitus der Pflanzen gestaucht.

3 Genotypen mit normal ausgeprägter Hypersensibilität (HK 2)

Diese zeigen stets Triebspitzendürre und Rindennekrosen, oft auch Blattspreitennekrosen. Typische Scharkasymptome auf der Blattspreite fehlen. Die Triebspitzendürre führt nicht zum Absterben des gesamten Sprosses, am basalen Bereich können einige gesunde Gewebereiche verbleiben.

4 Genotypen mit stark ausgeprägter Hypersensibilität (HK 3)

In diese Gruppe fallen alle Hybriden, bei denen sehr schnell Triebspitzendürre

einsetzt und die Triebe vollständig absterben (jeweils Boniturstufe 5).

Die Übergänge zwischen diesen Gruppen sind fließend. Konstatiert werden kann, dass die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV phänotypisch als quantitatives Merkmal einzustufen ist. Dies steht im Widerspruch zu der von KEGLER et al. (1986) postulierte These, dass die Hypersensibilität eine qualitative Resistenz ist, bei der nur eine Ja/Nein-Reaktion möglich ist (s. S. 23). Später allerdings relativierten KEGLER et al. (2001) diese von ihnen getroffene Aussage, indem sie am Beispiel der bereits erwähnten Nachkommenschaft von 'K4' mehrere Gruppen mit unterschiedlichem Hypersensibilitätsgrad bildeten. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, eine differenzierte Gruppenbildung vorzunehmen.

Der quantitative Charakter der Hypersensibilität gegenüber PPV ist in Abb. 2.1–8 zusammenfassend zum Ausdruck gebracht. Es gibt fließende Übergänge zwischen sensiblen und hypersensiblen Genotypen. Die Merkmale, die zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Formen und damit zur Bildung von Gruppen unterschiedlichen Hypersensibilitätsgrades herangezogen werden können, sind in der Abbildung aufgeführt. Da die Pflanzen ein und desselben

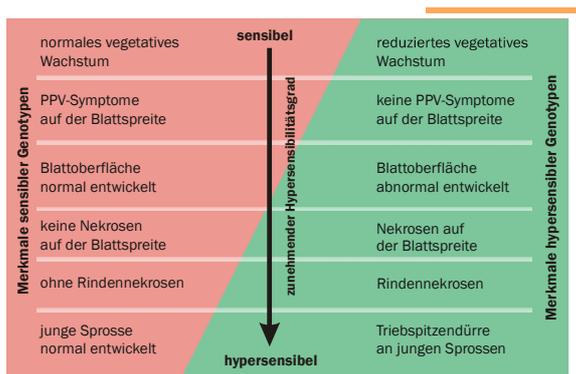


Abb. 2.1–8 Merkmale der Hypersensibilität in Gegenüberstellung zur Sensibilität (Empfindlichkeit) gegenüber PPV. Diese Merkmalsunterschiede treten nur bei Veredlung auf scharkabefallene Pflanzen auf.

Genotyps gleichförmig reagieren, kann geschlossen werden, dass die beobachtbaren Unterschiede zwischen den Genotypen genetisch determiniert sind.

Neuaustrieb nach Triebspitzendürre. Einige Genotypen bildeten nach Triebspitzendürre neue Knospen. Die Sprosse, die sich daraus entwickelten, zeigten über mehrere Monate hinweg keine Symptome von Hypersensibilität oder Sensibilität gegenüber PPV. In dieser Zeit konnte kein Virus in den Sprossen nachgewiesen werden, obwohl die Zwischenveredlung stark infiziert war. Über ein derartiges Verhalten der Europäischen Pflaume gegenüber PPV wurde bislang nicht berichtet. Der aufveredelte hypersensible Genotyp muss also über einen Mechanismus verfügen, der die Ausbreitung des Virus vom Zwischenveredlungsreis in die Triebe unterbindet. (Mögliche Resistenzstrategien sind in Kapitel 1.4.3 „Mechanismen der Virusresistenz“ auf S. 23 ff. vorgestellt.) Diese Mechanismen reichen aber offensichtlich nicht aus, um die Infektion des hypersensiblen Genotyps aus dem Zwischenveredlungsreis dauerhaft zu verhindern. Früher oder später bilden die Neuaustriebe Rindennekrosen und sterben ab. Dennoch ist es vorstellbar, dass diese Form der Resistenz eine natürliche Infektion im Feld verhindern kann, denn hier wirkt auf die Pflanzen kein vergleichbar permanenter und massiver Infektionsdruck wie im geschilderten Testsystem ein. Einschränkend muss bemerkt werden, dass der Neuaustrieb nach Triebspitzen-

dürre nicht bei allen Pflanzen desselben Genotyps beobachtbar war. Bei der Ausprägung dieses Reaktionstyps scheinen bislang unbekannte Faktoren eine Rolle zu spielen.

Reaktionsstärke im Vergleich zu ‘Jojo’. Die phänotypisch fassbare hypersensible Reaktion der Sorte ‘Jojo’ gegenüber PPV wurde von HARTMANN (1997), PETRUSCHKE und SCHRÖDER (1999) und HARTMANN und PETRUSCHKE (2002) detailliert beschrieben (s. Kapitel 1.5.2 „Überblick über die Hypersensibilität von *Prunus domestica* L. gegenüber PPV“ auf S. 37) und von GRÜNTZIG et al. (2001) bestätigt. Auch in den vorliegenden Untersuchungen reagierte ‘Jojo’ in entsprechender Weise. Keinesfalls aber zeigte diese Sorte die schnellste und heftigste Reaktion aller geprüften Genotypen. Darin wurde sie von verschiedenen Hybriden wie ‘Hoh 6563’ und ‘Hoh 6587’ übertroffen. Dies zeigt, dass Nachkommen von ‘Jojo’ einen höheren Hypersensibilitätsgrad als diese selbst besitzen können (s. auch Tab. 2.1–4 auf S. 54).

Entwicklung eines Hypersensibilitätsindex und daraus abgeleiteter Hypersensibilitätsklassen. Von mehr als 1150 Genotypen wurden die in Tab. 2.1–2 auf S. 44 aufgeführten Merkmale erfasst. Die Beobachtungen zeigen die genotypisch fixierte Variabilität des Merkmals Hypersensibilität. Um den Grad der Hypersensibilität eines Genotyps im Vergleich zu anderen darzustellen, wurde aus den Boniturdaten in Anlehnung an den von BIVOL et al. (1987) vorgestellten Krankheitsindex ein Hypersensibilitätsindex berechnet. Die erhobenen Boniturdaten sind ordinalskaliert. Je höher der Bonitурwert ist, desto höher ist der Beitrag, den das bonitierte Merkmal zur Hypersensibilität des bonitierten Genotyps leistet.

Aus den bonitierten Merkmalen wurden diejenigen ausgewählt, die zum Komplex Hypersensibilität einen entscheidenden Beitrag leisten: die Blattspreitennekrosen, die Rindennekrosen und die Triebspitzendürre. Diese Merkmale haben einen in der genannten Reihenfolge zunehmenden Einfluss auf den Komplex Hypersensibilität (s. Abb. 2.1–8). Unter Berücksichtigung dieses Sachverhalts wurde für jede bonitierte

Doppelpfropfung der Hypersensibilitätsindex (HI) nach folgender Gleichung errechnet:

$$HI = \frac{10 \cdot TI + 2 \cdot \frac{m_{RN}}{n_{RN}} + \frac{m_{BSN}}{n_{BSN}}}{13} \quad (1)$$

mit

$$TI = \frac{\frac{2m_{TSD_{kr}} + m_{L(TSD_{kr})}}{2n_{TSD} + n_L} + \frac{2m_{TSD_{ges}} + m_{L(TSD_{ges})}}{2n_{TSD} + n_L}}{2} \quad (2)$$

m gibt jeweils den ermittelten Boniturwert an, die Indices stehen für die bonitierten Merkmale (TSD_{kr} : Triebspitzendürre des kränksten Sprosses, TSD_{ges} : Triebspitzendürre des gesündesten Sprosses, RN : Rindennekrosen, BSN : Blattspreitennekrosen, $L(TSD_{kr})$: Länge des kränksten Triebes mit Triebspitzendürre, $L(TSD_{ges})$: Länge des gesündesten Triebes mit Triebspitzendürre). n_x ist der maximal mögliche Boniturwert für das jeweilige Merkmal x (z. B. n_L : maximal möglicher Boniturwert für das Merkmal „Länge des Triebes mit TSD“). Im vorliegenden Fall hat n_x immer den Wert 5 (s. Tab. 2.1–2 auf S. 44).

Gleichung (1) besteht letztlich aus drei Einzelindices: dem Index der Triebspitzendürre (TI), der zehnfach gewichtet wird, dem Rindennekrosenindex, der zweifach gewichtet wird, und dem Blattspreitennekrosenindex, der einfach in die Gleichung eingeht. Jeder der Einzelindices kann einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen, da die Boniturstufen jeweils durch den höchsten Wert, den sie annehmen können, dividiert werden und somit relative Werte sind.

Der TI wird aus den vier einzelnen Boniturstufen, die sich auf die Triebspitzendürre beziehen, errechnet (s. Gleichung (2)): In ihn gehen die Boniturstufen des kränksten und des gesündesten Triebes und die jeweiligen Längen der Triebe ein. Der Boniturwert der Triebspitzendürre wird zweifach gewichtet, da die Ausprägung der Triebspitzendürre gegenüber der Länge des Triebes eine größere Bedeutung zur Einschätzung der Hypersensibilität besitzt. Aus den beiden Werten für die Triebspitzendürre des kränksten und des gesündesten Triebes wird das arithmetische Mittel gebildet, das in die Formel zur Berechnung des HI eingeht.

Der HI eines Genotyps kann einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen. Bei einem Wert von 0 zeigt die Pflanze keinerlei Anzeichen von Hypersensibilität, bei einem Wert von 1 sind alle Merkmale, deren Boniturwerte in die Gleichung eingehen, so ausgeprägt, dass sie auf eine starke Hypersensibilität gegenüber PPV schließen lassen. Die Gewichtung der Boniturwerte der einzelnen Merkmale ist so ausgelegt, dass sich die in Tab. 2.1–3 dargestellten Zuordnungen zu den bereits vorgestellten Hypersensibilitätsklassen treffen lassen.

Tab. 2.1–3 Zuordnung von Genotypen der Europäischen Pflaume zu Hypersensibilitätsklassen (HK) in Abhängigkeit vom Hypersensibilitätsindex (HI)

Wert für HI	Reaktion gegenüber PPV	HK
[0,00; 0,10[normal empfindlich	0
[0,10; 0,40[schwach hypersensibel	1
[0,40; 0,70[normal hypersensibel	2
[0,70; 1,00]	stark hypersensibel	3

In der nachfolgenden Tab. 2.1–4 sind exemplarisch die HI und HK für einige untersuchte Genotypen wiedergegeben.

Tab. 2.1–4 Hypersensibilitätsindices (HI) und Hypersensibilitätsklassen (HK) ausgewählter Genotypen^a

Genotyp (ggf. Kreuzungskombination)	HI	HK
Cacaks Fruchtbare	0,00	0
Felsina	0,00	0
Hoh 4465 (Hanita × (Ort × Stan 34))	0,93	3
Hoh 5363 (Jojo × Presenta)	0,11	1
Hoh 4517 (Elena × (Ort × Stan 34))	0,76	3
Hoh 6587 ((Ort × Stan 34) × Jojo)	1,00	3
Jojo	0,71	3
Katinka	0,00	0
Klon 108 (K4 frei abgeblüht)	0,48	2
Klon 128 (K4 frei abgeblüht)	0,68	2
Ort × Gerst 17	0,72	3

- a Die angegebenen Daten beruhen auf einem Versuch mit PPV-Inokulation durch Doppelpfropfung. Die Reaktion der Pflanzen wurden insgesamt fünf Monate lang beobachtet. Die Sorte 'Felsina' reagiert in Langzeitversuchen häufig mit Rindennekrosen. Es kann angenommen werden, dass sich für 'Felsina' bei längerer Standzeit des Versuchs für HI ein höherer Wert als 0,00 ergeben hätte.

2.2 Testsysteme

Das Resultat eines Resistenztests hängt wesentlich von der verwendeten Testmethode ab (s. Kapitel 1.4.4.1 „Resistenzprüfung“ auf S. 24). Um die Ausprägungsformen der Hypersensibilität gegenüber PPV zu beschreiben, ist es daher notwendig, Ergebnisse aus verschiedenen Testsystemen zu betrachten und miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden die Art der Inokulation mit dem Virus und das verwendete Virusisolat als Einflussgrößen auf die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharakavirus untersucht.

2.2.1 Pfropfungen auf scharkainfizierte Bäume im Freiland

Material und Methoden

Achtundsechzig der im Gewächshaus durch Doppelveredlung getesteten Genotypen wurden in drei Wiederholungen auf zehnjährige, mit PPV-D seit Jahren infizierte Bäume in der Scharkaversuchsanlage der Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart in Weil der Stadt veredelt. Zum Teil wurden die Edelreiser Anfang Mai hinter die Rinde gepfropft, zum Teil Anfang April mit ei-

nem Gerät des Modells Topgrafter auf einjährige Triebe der Bäume veredelt. Die Edelreiser eines Genotyps wurden auf jeweils zwei verschiedene Bäume verteilt. Auf einen Baum wurden bis zu zehn verschiedene Genotypen veredelt. Bonituren erfolgten Ende Juni und Anfang August. Das Boniturschema ist in Tab. 2.1–2 auf S. 44 angegeben. Aus den Boniturdaten wurde der Hypersensibilitätsindex als arithmetisches Mittel der Indices der Wiederholungen errechnet und daraus die Hypersensibilitätsklasse abgeleitet. Diese Daten wurden mit den analog errechneten Werten aus der Prüfung der Genotypen durch Doppelpfropfung im Gewächshaus (s. Kapitel 2.1 „Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften“ auf S. 42) verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Sämtliche Ausprägungsformen der Hypersensibilität, die an Pflanzen im Testsystem „Doppelpfropfung im Gewächshaus“ beobachtet wurden (s. S. 50ff.), traten auch bei Propfung im Freiland auf (s. Abb. 2.2–1). Ein Einfluss der Veredlungsart war nicht feststellbar.

Tab. 2.2–1 Vergleich der Testsysteme „Doppelpfropfung im Gewächshaus (GH)“ und „Veredlung auf scharkabefallene Bäume im Freiland“ anhand der in beiden Testsystemen ermittelten Hypersensibilitätsindices und Hypersensibilitätsklassen

Kreuzungs-kombination	Zuchtklon Hoh Nr.	Hypersensibilitätsindex			Hypersensibilitätsklasse		
		GH	Freiland	Differenz ^a	GH	Freiland	Differenz ^a
Hoh 4465 × Jojo	7909	0,00	0,00	0,00	0	0	0
	7918	0,93	0,87	0,07	3	3	0
	7935	1,00	0,96	0,04	3	3	0
	7938	1,00	0,93	0,07	3	3	0
	7945	1,00	0,93	0,07	3	3	0
	7957	1,00	0,93	0,07	3	3	0
	7960	1,00	0,89	0,11	3	3	0
	7973	0,94	0,94	0,00	3	3	0
	7975	0,82	0,94	0,12	3	3	0
Hoh 4515 × Jojo	8003	0,00	0,00	0,00	0	0	0
	8013	0,59	0,42	0,16	2	2	0
	8022	0,00	0,00	0,00	0	0	0
Elena × (Ort × Stan 34)	4543	0,87	0,90	0,03	3	3	0
	4601	0,77	0,74	0,02	3	3	0
	4608	0,90	0,78	0,12	3	3	0
	4632	0,90	0,52	0,38	3	2	1
	4648	0,93	0,93	0,00	3	3	0

Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV

Tab. 2.2-1 Vergleich der Testsysteme „Doppelpfropfung im Gewächshaus (GH)“ und „Veredlung auf scharkabefallene Bäume im Freiland“ anhand der in beiden Testsystemen ermittelten Hypersensibilitätsindices und Hypersensibilitätsklassen

Kreuzungs- kombination	Zuchtklon Hoh Nr.	Hypersensibilitätsindex			Hypersensibilitätsklasse		
		GH	Freiland	Differenz ^a	GH	Freiland	Differenz ^a
Fellenberg × Jojo	6601	0,88	0,84	0,05	3	3	0
	6603	0,93	0,89	0,05	3	3	0
	6621	1,00	0,81	0,19	3	3	0
	6625	1,00	0,93	0,07	3	3	0
	6627	0,82	0,81	0,01	3	3	0
Hanita × Jojo	5910	0,74	0,79	0,04	3	3	0
	5911	0,72	0,90	0,18	3	3	0
	5912	0,80	0,90	0,10	3	3	0
	5925	0,83	0,79	0,04	3	3	0
	5928	1,00	0,88	0,12	3	3	0
	5933	0,86	0,83	0,03	3	3	0
	5942	0,80	0,88	0,08	3	3	0
	5944	0,95	1,00	0,05	3	3	0
	5953	0,90	0,07	0,83	3	0	3
Jojo × Hoh 4465	7736	1,00	0,87	0,13	3	3	0
	7761	0,60	0,00	0,60	2	0	2
	7762	0,80	0,87	0,07	3	3	0
Jojo × Fellenberg	7493	0,88	0,75	0,13	3	3	0
	7489	0,48	0,83	0,35	2	3	1
Jojo × Felsina	6404	0,03	0,05	0,02	0	0	0
	7350	0,15	0,13	0,02	1	1	0
Jojo × Hanita	6021	0,76	0,88	0,12	3	3	0
	6372	0,96	1,00	0,04	3	3	0
Jojo × Katinka	6726	1,00	0,77	0,23	3	3	0
	6759	0,06	0,10	0,04	0	1	1
Jojo × Klon 108	6868	0,08	0,10	0,02	0	1	1
	6869	0,03	0,00	0,03	0	0	0
Jojo × Klon 128	6968	0,06	0,11	0,05	0	1	1
Jojo × Presenta	5276	0,85	0,89	0,04	3	3	0
	5278	0,00	0,00	0,00	0	0	0
	5350	0,46	0,85	0,39	2	3	1
	5357	0,79	0,80	0,01	3	3	0
Jojo × Zwintschers Frühe	6415	0,97	1,00	0,03	3	3	0
	6423	1,00	0,94	0,06	3	3	0
	6484	1,00	0,68	0,32	3	2	1
	6494	0,82	0,90	0,08	3	3	0
	6495	0,85	0,91	0,06	3	3	0
	6501	0,87	0,95	0,08	3	3	0
(Ort × Stan 34) × Hanita	4444	1,00	0,94	0,06	3	3	0
	4455	0,03	0,90	0,87	0	3	3
	4470	0,79	0,89	0,10	3	3	0
	4478	0,90	0,86	0,04	3	3	0
	4484	0,80	0,82	0,02	3	3	0
	4495	0,88	0,46	0,42	3	2	1
	4500	1,00	0,82	0,18	3	3	0
	4505	0,95	0,89	0,06	3	3	0
	4580	1,00	0,92	0,08	3	3	0
(Ort × Stan 34) × Jojo	6557	1,00	0,83	0,17	3	3	0
	6567	1,00	0,89	0,11	3	3	0
	6570	1,00	0,46	0,54	3	2	1
	6591	0,59	0,52	0,07	2	2	0
Mittelwert			0,13				

a Die Differenz gibt den absoluten Unterschied zwischen den Hypersensibilitätsindices bzw. Hypersensibilitätsklassen der beiden Varianten (GH und Freiland) eines Genotyps an. Die Zahlen sind auf zwei Stellen gerundet.



Abb. 2.2-1 Spezielle Aspekte der Triebspitzendürre als Reaktion auf PPV-Infektion. **A** Bei gleichem Inokulum und konstanten Umweltfaktoren erfolgt die Reaktion auf PPV-Befall gleichförmig: Alle drei Pflanzen (Wiederholungen) des Genotyps 'Hoh 4640' zeigen nach Inokulation durch Doppelpfropfung gleich stark ausgeprägte Triebspitzendürre. **B** 'Hoh 4455' nach Pfropfung auf PPV-infizierten Baum des Zuchtklons 'Hoh 1022': Der Austrieb des Edelreises stirbt ab. **C/D** 'Hoh 4470' als Doppelveredlung im Foliengewächshaus (C) und als Pfropfung auf scharkainfizierten Baum des Zuchtklons 'Hoh 1022' (D): Der hypersensible Genotyp reagiert jeweils gleichförmig mit Triebspitzendürre. **E/F** An Austrieben von Propfungen auf scharkabefallene Bäume entwickeln sich die gleichen Symptome von Hypersensibilität wie bei Doppelpfropfung: Triebspitzendürre der Boniturstufe 4 (E, 'Hoh 7905') und Blattspreitennekrosen der Boniturstufe 3 (F, 'Hoh 7919'). **G** Scharkainfiziertes Edelreis der Sorte 'Elena', veredelt auf einen Baum des hypersensiblen Zuchtklons 'Hoh 4517': Das scharkainfizierte Edelreis wird abgestoßen.

In Tab. 2.2-1 sind für die 68 im Gewächshaus und im Freiland getesteten Genotypen die im jeweiligen Testsystem ermittelten HI und HK angegeben. Wie daraus ersichtlich ist, wurden 56 (82,4%) der 68 überprüften Genotypen mit bei-

den Testmethoden der gleichen HK und 9 (13,2%) einer nächstliegenden Klasse zugeordnet. Da die Bildung der HK aus dem HI abgeleitet wird, ist eine derartige Abweichung um eine Resistenzklasse naturgemäß möglich. Bei drei der

neun betreffenden Genotypen war die Differenz der HI zwischen den Testsystemen nicht größer als 0,05.

Nur in drei Fällen (4,4%) war die Differenz der HI bei den Varianten eines Genotyps so groß, dass die gleichen Hybriden beim einem Testverfahren als nicht hypersensibel oder schwach hypersensibel, beim anderen als normal oder stark hypersensibel eingestuft wurden. Bei einem Genotyp ergab sich im Freilandtest, bei zweien im Gewächshaustest die Einordnung in die höhere HK. Es kann daher nicht gefolgert werden, dass eine der beiden Testmethoden Genotypen tendentiell als stärker oder als schwächer hypersensibel einstuft.

Beide Testsysteme sind demnach gleich gut für die Bewertung der Hypersensibilität eines Genotyps gegenüber PPV geeignet. Ergebnisse, die mit den beiden verschiedenen Methoden erzielt wurden, können miteinander verglichen werden.

2.2.2 Einfluss des Virusisolats und der Inokulationsmethode

Die Hybride 'K4' reagiert nur gegenüber bestimmten Isolaten des Scharkavirus mit einer hypersensiblen Reaktion (KEGLER et al. 1991). Die hypersensible Sorte 'Jojo' leitet nach Inokulation mit allen bislang getesteten PPV-Isolaten eine HR ein (PETRUSCHKE und SCHRÖDER 1999, GRÜNTZIG et al. 2001). Ziel der Untersuchungen war es, Pflanzen der Sorte 'Jojo' mit bislang für Hypersensibilitätstests nicht verwendeten Isolaten des Scharkavirus zu inokulieren, um zu testen, ob die Hypersensibilitätsresistenz von einzelnen Isolaten durchbrochen werden kann. Hierfür wurde mit der Inokulation durch Rindenspäne eine weitere Testmethode verwendet, die mit der Inokulation durch Doppelpfropfung verglichen wurde. Zudem wurde untersucht, ob Nachkommen der Sorte 'Jojo' unterschiedlich auf Inokulation mit verschiedenen Virusstämmen reagieren.

2.2.2.1 Einfluss des Virusisolats auf die Auslösung und den Verlauf der HR bei der Sorte 'Jojo'

Material und Methoden

Einjährige, unverzweigte Veredlungen der Sorte 'Jojo' auf Myrobalanensämlingen als Unterlage wurden im Januar mit je vier Rindenspänen inokuliert. Diese wurden Edelreisern verschiedener Herkünfte der Europäischen Pflaume entnommen, die von scharkainfizierten Bäumen stammten. Sechs verschiedene Scharkavirusisolate (s. Tab. 2.2–2) wurden in jeweils vier Wiederholungen als Inokulum verwendet. Zur Kontrolle der Infektiosität der zur Inokulation bestimmten Edelreiser wurden Rindenschilde eines jeden Virusisolats zusätzlich in je zwei einjährige Bäume der sensiblen Sorten 'Hauszweitsche, Typ Schüfer' und 'Cacaks Fruchtbare' veredelt. Die Bäume wurden im Gewächshaus aufgestellt und wie in Kapitel 2.1 „Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften“ auf S. 42 beschrieben kultiviert. Der Virusnachweis an Blättern der inokulierten Pflanzen wurde drei Monate nach dem Austrieb mit DAS-ELISA und IC-PCR durchgeführt.

Ergebnisse

Sämtliche zur Kontrolle verwendeten Bäume der Sorten 'Hauszweitsche, Typ Schüfer' und 'Cacaks Fruchtbare' zeigten ab der sechsten Woche nach der Inokulation deutliche Blattsymptome der Scharkakerkrankung. Die Symptomstärke schwankte zwischen den PPV-Varianten. Die stärksten Symptome wurden bei beiden Genotypen bei den Isolaten 'Tschechien 3' und 'CG' ausgeprägt, die geringsten beim Isolat 'Tschechien 1'. Die restlichen Isolate nahmen eine Mittelstellung ein.

Die Reaktion der Sorte 'Jojo' auf Inokulation mittels *chip budding* ist in Tab. 2.2–2 dargestellt. Sämtliche Virusisolate lösten die HR aus. Zu bemerken ist, dass es Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit gab. Beim Isolat 'Tschechien 3' zeigten sich Rindennekrosen und Triebspitzendürre 10 Tage früher als bei den anderen Isolaten. Auf der Blattspreite waren keine Scharkasymptome sichtbar. Keiner der Bäume starb vollständig ab. Triebspitzendürre und Rindenne-

Tab. 2.2–2 Reaktion der Sorte 'Jojo' auf Inokulation mit verschiedenen Scharkavirusisolaten mittels *chip budding* (Erläuterung der Boniturwerte: s. Tab. 2.1–2 auf S. 44)

PPV-Isolat	Stammzuordnung	Triebspitzen-dürre	Rinden- nekrosen	Blattspreiten- nekrosen	Rindenspäne abgestoßen ^a
Tschechien ^b 1	PPV-D	5	5	0	+
Tschechien 2	PPV-Rec	0	4	1	+
Tschechien 3	PPV-M	5	5	0	+
CG ^c	PPV-Rec	4	4	1	+
Weil der Stadt 1	PPV-D	4	4	0	+
Weil der Stadt 2	PPV-M	5	4	0	+

a +: Rindenspäne mehrheitlich abgestoßen, -: sämtliche Rindenspäne dauerhaft verwachsen, o: intermediär

b Die Isolate aus der Tschechischen Republik wurden freundlicherweise von J. Polák (Research Institute of Crop Production, Division of Phytomedicine, Prag) zur Verfügung gestellt.

c Das Isolat 'CG' wurde freundlicherweise von H. Kegler, Aschersleben, zur Verfügung gestellt.

krosen zeigten vor allem diejenigen Sprosse, die sich aus Knospen entwickelten, die den eingesetzten Rindenspänen benachbart waren. Andere Sprosse an derselben Pflanze entwickelten sich völlig normal. Mit DAS-ELISA- und IC-PCR-Tests konnte in ihnen kein Virus nachgewiesen werden.

In seltenen Fällen zeigten Austriebe der Unterlage (Myrobalane) Scharkasymptome. Dies trat bei einer Pflanze auf, die mit dem Isolat 'Tschechien 3' inokuliert war. Blattspreitennekrosen traten nur selten und in schwacher Intensität und dann nur in den ersten Tagen nach dem Austrieb auf.

Die meisten der eingesetzten Rindenspäne wurden ca. 10 Wochen nach der Veredlung abgestoßen: Das Gewebe rund um die Chips nekrotisierte, teilweise trat Gummifluss auf, schließlich starben die Rindenspäne ab (s. Abb. 2.2–2). Einige Chips verwachsen dauerhaft und wurden nicht abgestoßen. Da in deren Nachbarschaft die Austriebe keine Anzeichen von Hypersensibilität zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass diese keine Viren enthielten.

Diskussion

Die Sorte 'Jojo' reagierte gegenüber allen sechs getesteten Virusisolaten hypersensibel. Damit bestätigte sich die Beobachtung von PETRUSCHKE und SCHRÖDER (1999) und GRÜNTZIG et al. (2001), dass die HR bei 'Jojo' von verschiedenen PPV-Isolaten ausgelöst wird. Das Isolat 'CG', das

bei 'K4' HR bedingt, verursacht diese auch bei 'Jojo'. Die HR-auslösende Wirkung bei 'Jojo' ist damit für insgesamt zwölf PPV-Isolate bestätigt: Sechs Isolate wurden von den oben genannten Autoren verwendet, sechs weitere im vorliegenden Versuch.

Einige Isolate verursachten rascher einsetzende und stärkere Hypersensibilitätsreaktionen als andere. Möglich ist, dass dies mit der Viruskonzentration in den Rindenspänen zusammenhängt, also mit der Größe des auf die Pflanze einwirkenden Inokulums. Beim Isolat 'Tschechien 2' beispielsweise konnte keine Triebspitzen-dürre beobachtet werden. Vermutlich war die Viruskonzentration in den für die Inokulation verwendeten Rindenspänen zu niedrig. In jedem Fall kam es auch bei diesem Isolat zu einer Isolierung des Virus. Bemerkenswert ist, dass gerade diejenigen Isolate, die eine schnelle und starke HR bedingten, bei empfindlichen Sorten ('Cacaks Fruchtbare', 'Hauswetsche, Typ Schüfer') besonders starke Symptome auf der Blattspreite hervorriefen. Dies ist Indiz dafür, dass sich diese Isolate besonders rasch in der Pflanze vermehren können. Diese Vermutungen bedürfen experimenteller Bestätigung.

Vereinzelt zeigten auch die Unterlagen nach Inokulation von 'Jojo' mittels *chip budding* Scharkasymptome. Das bedeutet, dass Viren aus dem Inokulationschip über die Veredlungsstelle ins Phloem (oder Xylem) und von dort aus Richtung Wurzel gelangt sind. Dass es einen derartigen Transportmechanismus gibt, wird auch von



Abb. 2.2-2 Reaktionen der Sorte 'Jojo' auf Inokulation mit verschiedenen PPV-Isolaten mittels chip budding. **A** Inokulation mit Isolat 'Tschechien 3'. Der Spross unmittelbar über der Inokulationsstelle stirbt ab, der entfernter gelegene entwickelt sich völlig normal. **B** Derselbe Spross wie in A, zehn Tage später. Inzwischen in der Austrieb völlig abgestorben. Der Rindenspan, der zur Inokulation verwendet wurde, wird abgestoßen (sichtbar am Eintrocknen der Rinde). **C** Beginnende Rindennekrose nach Inokulation mit dem Isolat 'Tschechien 2'.

der Tatsache bestätigt, dass Rindennekrosen und Triebspitzendürre an Sprossen entstehen können, die abseits der Inokulationsstelle liegen.

Sprosse unmittelbar neben der Inokulationsstelle zeigen stets die stärksten Hypersensibilitätsreaktionen, was darauf hindeutet, dass die Viruskonzentration bei der Ausprägung der HR eine große Rolle spielt.

Nach Inokulation durch Rindenspäne reagiert die Sorte 'Jojo' mit wesentlich mildereren Hypersensibilitätsreaktionen als nach Inokulation mittels Doppelpfropfung. Hier gilt es zu beachten, dass die Inokulation durch Doppelpfropfung eine prinzipiell andere Testmethode darstellt: Durch die infizierte Zwischenveredlung, die der Phloem- und Xylemstrom passieren müssen, erfolgt zwangsweise ein ständiger Virusnachschieb in das aufveredelte Edelreis. Bei Chipinokulation kann der Rindenspan, der an sich bereits ein geringeres Inokulum enthält als ein Zwischenveredlungsreis, vom hypersensiblen Genotyp durch nekrotische Reaktionen abgeschottet werden. Zudem ist für den Phloem- und Xylemtransport nicht notwendigerweise die Passage des virusinfizierten Bereichs notwendig, so dass der Viruseintrag in den Gewebebereich des hypersensiblen Genotyps geringer ist. Die Inokulation durch Doppelpfropfung eignet sich demzufolge vor allem dazu, die Stärke der Absterbeerscheinungen zu prüfen, die ein Genotyp als Folge der HR zeigt. Die Inokulation durch Rindenspäne hingegen überprüft die Fähigkeit des Genotyps, die Vermehrung und Verbreitung des Virus zu verhindern und es dauerhaft auf bestimmte Gewebebereiche zu lokalisieren.

Soll ein Genotyp auf das Vorliegen von Hypersensibilität getestet werden, ist die Methode der Doppelpfropfung mit scharkainfizierter Zwischenveredlung vorzuziehen: Sie ermöglicht die Schaffung einheitlicherer Bedingungen als die Inokulation durch Rindenspäne, und der aufveredelte Genotyp wird gezwungen, das gesamte genetisch determinierte Abwehrpotential gegen die Virusinokulation aufzuwenden. Liegt Hypersensibilität vor, so ist es als zweiten Schritt angebracht, durch *chip budding* oder durch Einveredeln eines oder mehrerer PPV-infizierter Edelreiser die Fähigkeit des Genotyps zur Lokalisierung des Virus zu untersuchen.

Tab. 2.2–3 Einfluss des PPV-Stammes auf die Hypersensibilitätsindices und -klassen verschiedener Nachkommen aus Kreuzungen mit den hypersensiblen Genotypen 'Jojo' und 'Ort×Stan34' als Elternteil

Kreuzungs-kombination	Zuchtklon Hoh Nr.	Hypersensibilitätsindex			Hypersensibilitätsklasse		
		PPV-D	PPV-M	Differenz ^a	PPV-D	PPV-M	Differenz ^a
(Ort×Stan34)×Hanita	4571	0,87	0,89	0,02	3	3	0
Jojo×Presenta	5333	0,00	0,00	0,00	0	0	0
Jojo×Felsina	5381	0,95	0,96	0,01	3	3	0
Hanita×Jojo	5912	0,84	0,91	0,07	3	3	0
	5925	0,87	0,91	0,04	3	3	0
	5946	0,00	0,00	0,00	0	0	0
Jojo×Zwintschers Frühe	6482	0,90	0,87	0,03	3	3	0

a Die Differenz gibt den absoluten Unterschied zwischen den Hypersensibilitätsindices bzw. Hypersensibilitätsklassen der beiden Varianten (PPV-D und PPV-M) eines Genotyps an. Die Zahlen sind auf zwei Stellen gerundet

2.2.2 Einfluss des Virusstammes auf die Auslösung und den Verlauf der HR bei Nachkommen der Sorte 'Jojo'

Material und Methoden

Sieben Hybriden aus dem Hohenheimer Züchtungsprogramm, sämtlich Nachkommen der Sorte 'Jojo' oder ihres Geschwisterzuchtklons 'Ort×Stan34' (s. Tab. 2.2–3), wurden auf seit 10 Jahren scharkainfizierte Bäume der Sorte 'Hanita' in der Scharkaversuchsanlage Weil der Stadt veredelt. Jeweils vier Edelreiser pro Genotyp wurden auf einen mit einem Isolat des M-Stammes und auf einen mit einem Isolat des D-Stammes infizierten Baum veredelt. Es standen zwei Bäume mit PPV-D und ein Baum mit PPV-M zur Verfügung. Die Reiser eines Genotyps wurden auf alle drei Bäume verteilt (zwei Veredlungen auf je einem Baum mit PPV-D, vier Veredlungen auf dem Baum mit PPV-M). Methodische Details sind im Kapitel 2.2.1 „Pfropfungen auf scharkainfizierte Bäume im Freiland“ auf S. 55 beschrieben. Aus den Boniturdaten wurde der HI und die HK für jeden Genotyp und jede PPV-Stamm-Variante errechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Zwischen den PPV-Stamm-Varianten traten keine erkennbaren Unterschiede in der Reaktion der Genotypen auf. In Tab. 2.2–3 sind die aus den Boniturdaten errechneten Hypersensibilitätsindices und -klassen angegeben.

Die HI zwischen den Genotypen unterschieden sich nur geringfügig. Entsprechend wurden die Genotypen in beiden Varianten in die gleiche HK eingestuft. Die Daten belegen, dass die Ausprägung der Hypersensibilität gegenüber PPV auch bei den Nachkommen der Sorte 'Jojo' und des Zuchtklons 'Ort×Stan34' nicht oder nur in geringem Umfang vom Virusstamm, der die HR auslöst, abhängt. Weitere Isolate des Scharkavirus sind zu prüfen.

2.2.3 Schlussfolgerungen

Nachkommen der Sorte 'Jojo' sowie ihres Geschwisterzuchtklons 'Ort×Stan34' variieren sehr stark hinsichtlich des Grades der von ihnen ausgeprägten Hypersensibilität gegenüber PPV. In den Nachkommenschaften treten empfindliche Genotypen ebenso auf wie solche, die stärker hypersensibel reagieren als 'Jojo'. Sämtliche Übergänge zwischen diesen Extremen sind möglich.

Für die Beurteilung des Hypersensibilitätsgrades eignen sich die Merkmale Blattsprennenkrosen, Rindennekrosen und Triebspitzendürre.

Die Berechnung des Hypersensibilitätsindex und die daraus abgeleitete Zuordnung zu Hypersensibilitätsklassen ermöglicht den unmittelbaren Vergleich von Genotypen hinsichtlich ihres Hypersensibilitätsgrades und schafft eine

Basis für die nachvollziehbare Bewertung von Einflussfaktoren auf die Hypersensibilität.

Der verwendete Virusstamm spielt bei der Ausprägung der in der Sorte 'Jojo', ihrem Geschwisterzuchtklon 'Ort×Stan34' und ihren Nachkommen determinierten Hypersensibilität eine untergeordnete Rolle. Diese Aussage kann nicht verallgemeinert werden, da es Genotypen wie 'K4' und deren Nachkommen gibt, bei denen nur bestimmte Isolate des Scharkavirus HR auslösen.

Entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung der HR hat die Inokulationsmethode. Best-

geeignet für Hypersensibilitätstests sind die Doppelpfropfung mit scharkainfizierter Zwischenveredlung im Gewächshaus und die Veredlung auf scharkabefallene Bäume im Freiland. Die Ergebnisse aus diesen beiden Testmethoden sind miteinander vergleichbar. Nach Inokulation durch Rindenspanveredlung verläuft die hypersensible Reaktion der inokulierten Pflanze allgemein schwächer als bei den erstgenannten Testsystemen. Hiermit kann die Fähigkeit eines hypersensibel reagierenden Genotyps, das Virus zu lokalisieren, abgeschätzt werden.

3 Nachweis und Auswirkungen der hypersensiblen Reaktion gegenüber PPV

Die Einstufung der Absterbeerscheinungen bestimmter Genotypen der Europäischen Pflaume nach massiver Inokulation mit PPV als hypersensible Reaktion geht auf makroskopische Beobachtungen von KEGLER et al. (1985) zurück.

Mit den vorliegenden Untersuchungen sollten die Hypersensibilitätsreaktion auf zellulärer Ebene nachgewiesen und deren Auswirkungen auf die Abwehr des Virus untersucht werden.

3.1 Zelltod im Bereich der Veredlungsstelle

Zielstellung. Wird das Reis eines hypersensiblen Genotyps auf eine scharkainfizierte Pflanze veredelt, so stirbt das hypersensible Reis kurze Zeit nach dessen Austrieb ab. Umgekehrt sterben die Sprosse eines PPV-infizierten Edelreises nach dem Austrieb ab, wenn es auf den Baum einer hypersensiblen Sorte veredelt wird (PETRUSCHKE und SCHRÖDER 1999). Untersucht werden sollte, ob es im Bereich der Veredlungsstelle Veränderungen gibt, die in Zusammenhang mit diesen Erscheinungen stehen.

Material und Methoden

Anfang Januar 2003 wurden mit der Veredlungsmaschine des Modells Topgrafter (s. S. 42) je 60 Reiser der Sorten 'Jojo', 'Ortenauer' und 'K4' auf virusfreie Myrobalanensämlinge als Unterlage veredelt. Es wurden lange Reiser mit mindestens acht Knospen verwendet. Die Pflanzen wurden in Torf-Ton-Substrat (Floraton 2 der Firma Floragard) getopft und für fünf Tage bei 3°C im Sarangewächshaus der Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart aufgestellt. Danach wurde die Temperatur auf 15°C erhöht (Lüftungstemperatur: 18°C). Austriebe der Unterlage wurden lau-

fund entfernt. Vier Wochen nach der Veredlung, als die Edelreiser auszutreiben begannen, wurden in jedes Edelreis fünf Rindenspäne der Sorte 'Hannita' veredelt. Edelreiser mit nachfolgend genanntem Virusstatus wurden für die Gewinnung der Rindenspäne verwendet:

- PPV-frei (Baumschule Kiefer, Ortenberg),
- infiziert mit PPV-M (Scharkaversuchsanlage Weil der Stadt, Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart),
- infiziert mit PPV-D (Scharkaversuchsanlage Weil der Stadt, Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart).

Von jeder Genotyp-Rindenspankombination wurden 20 Bäume veredelt.

Beginnend 17 Tage nach dem Einsetzen der Chips, also etwa zu dem Zeitpunkt, zu dem erste neu gebildete Zellen in den Veredlungsspalt einwachsen, wurden zweimal pro Woche je einer Pflanze pro Variante Gewebeproben entnommen: Das Edelreis wurde von der Unterlage abgetrennt, und die Sprosstücke mit den eingesetzten

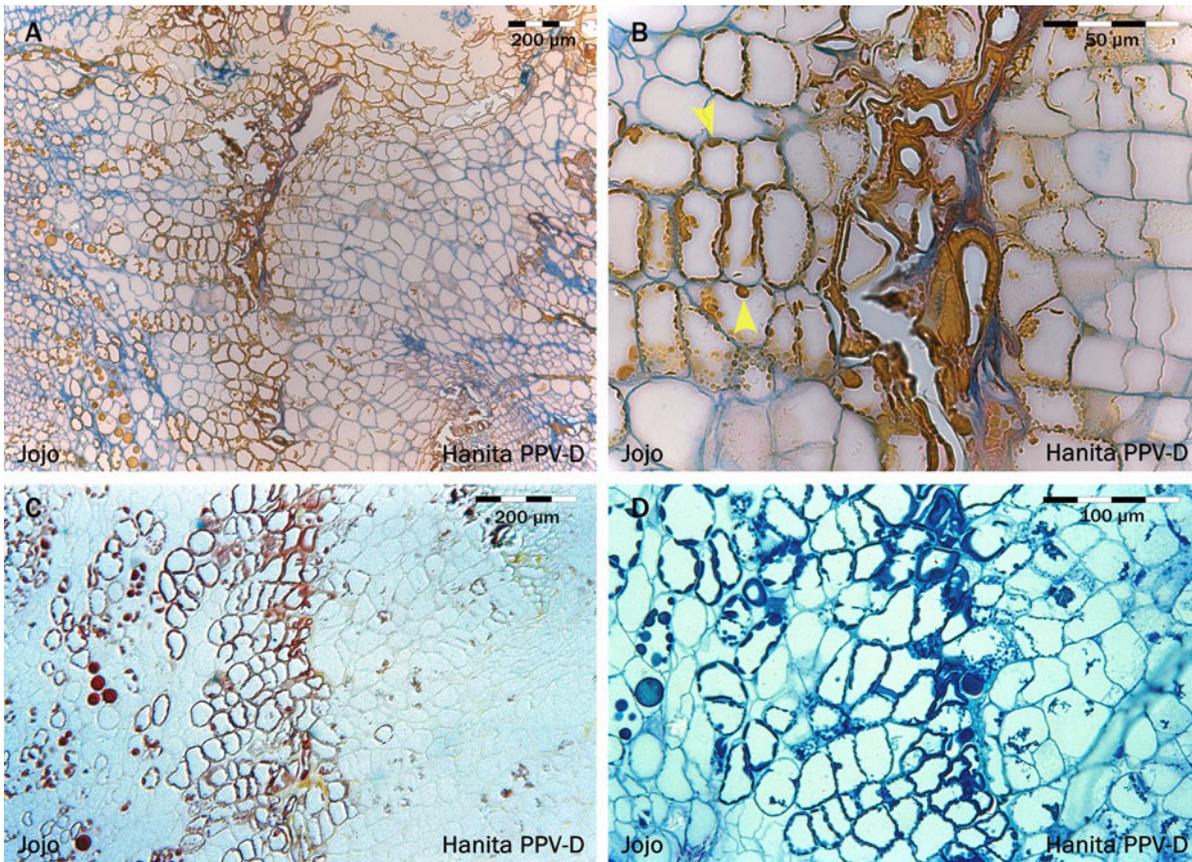


Abb. 3.1-1 Histologische Schnitte durch die Veredlungsstelle (Chip der Sorte 'Hanita', infiziert mit PPV-D, auf 'Jojo'), sechs Wochen nach der Veredlung. **A** In Zellen im Grenzbereich zwischen den Geweben der beiden Veredlungspartner akkumulieren Phenylpropanoide (orange angefärbt). ACN-Färbung. **B** Vergrößerung aus A. Einige Zelllagen kollabieren. In Zellen von 'Jojo' akkumulieren phenolische Substanzen. **C** Rotfärbung von Phenylpropanoiden nach saurer Hydrolyse. Nur in Zellen von 'Jojo' reichern sich phenolische Komponenten an. **D** Blaufärbung von Phenylpropanoiden mit Toluidinblau zeigt das gleiche Resultat wie C.

Rindenspänen wurden aus diesem herausgeschnitten. Mit einem Skalpell wurde das Sprosssegment so halbiert, dass sich der Rindenspan auf einer Hälfte befand. Diese Sprosstückhälfte wurden fixiert und entwässert (s. S. 43). Nach dem Entwässern wurden mit einer Bügelsäge mit feinem Sägeblatt 3 mm breite Querschnitte der Sprosstückhälften angefertigt; diese wurden eingebettet wie ab S. 43 beschrieben. Von den Proben wurden je 16 Semidünnschnitte angefertigt und diese mit ACN-Färbelösung gefärbt (s. S. 45). Zusätzlich wurden je vier Schnitte pro Variante mit Toluidinblau (GUTMANN 1995) und 6 M butanolischer Schwefelsäure (GUTMANN 1993) behandelt. Nach dem Trocknen wurden mit Eukitt als Einschlussmittel Dauerpräparate hergestellt. Die Auswertung erfolgte mit den gleichen optischen Geräten wie auf S. 45 beschrieben.

Ergebnisse

Bereits 17 Tage nach dem *chip budding* war der Veredlungsspalt mit kallusartigem Gewebe gefüllt. In den ersten vier Wochen nach der Pfropfung waren zwischen den Varianten keine Unterschiede in der Anatomie der Veredlungsstelle erkennbar. Im weiteren Verlauf akkumulierten im Veredlungsspalt bei den Kombinationen 'Hanita' PPV-M und PPV-D auf 'Jojo' Phenylpropanoide in Vakuolen von Zellreihen, die im Grenzbereich zwischen den Geweben der beiden Genotypen lagen. Die Phenylpropanoide wurden mit ACN-Färbung orange, mit Toluidinblau blau und durch schwefelsaure Hydrolyse rot gefärbt. Etwa fünf Tage später starben diese Zellen ab, was am Zusammenbruch der zellulären Kompartimentierung und der Auflösung der Zellgrenzen sichtbar wurde. Dadurch bildete sich eine nekrotische

Tab. 3.1–1 Reaktion verschiedener Genotypen auf Inokulation mit PPV-D und PPV-M durch chip budding. Die Phenolakkumulation und das Auftreten von Zelltod wurde aufgrund histologischer und histochemischer Untersuchungen an der Veredlungsstelle bestimmt.

Sorte	PPV-Stamm	Phenolakkumulation	Zelltod	Chip abgestoßen
K4	Kontrolle	nein	nein	nein
	PPV-M	ja	ja	ja
	PPV-D	vereinzelt	vereinzelt	vereinzelt
Jojo	Kontrolle	nein	nein	nein
	PPV-M	ja	ja	ja
	PPV-D	ja	ja	ja
Ortenauer	Kontrolle	nein	nein	nein
	PPV-M	vereinzelt	nein	vereinzelt
	PPV-D	nein	nein	nein

Linie, die den Veredlungsspalt durchzog. Nicht immer war der gesamte Zellverband, der sich im Veredlungsspalt gebildet hatte, gleichmäßig betroffen, so dass die nekrotische Linie von Bereichen gesunden Gewebes unterbrochen wurde. Auch in der Veredlungskombination von 'Hanita' PPV-M auf 'K4' konnte die Akkumulation von Phenylpropanoiden und das Absterben von Zellreihen beobachtet werden. In den anderen Varianten war dies nicht der Fall. Abb. 3.1–1 und Abb. 3.1–2 zeigen histologische Schnitte durch die Verwachsungszone an der Veredlungsstelle.

Die mikroskopisch sichtbaren Veränderungen spiegelten sich in den makroskopischen Beobachtungen wider: Die Rindenspäne der PPV-infizierten Varianten von 'Hanita' auf 'Jojo' und von 'Hanita' PPV-M auf 'K4' wurden nach und nach abgestoßen, am schnellsten die Rindenspäne der Variante 'Hanita' PPV-M auf 'Jojo'. In diesem Fall waren bereits acht Wochen nach der Veredlung sämtliche Rindenspäne abgestorben. Bei den anderen Varianten, die mit Absterbeerscheinungen im Gewebe des Veredlungsspalts reagierten, starben die meisten Rindenspäne in einem Zeitraum zwischen sechs und zwölf Wochen nach der Veredlung ab. Das Gewebe der Sorten 'Jojo' bzw. 'K4', das die Rindenspäne umgab, nekrotisierte in unregelmäßig breiten Streifen um die Veredlungsstelle.

Die Akkumulation phenolischer Komponenten und das Absterben von Zellverbänden im Veredlungsspalt konnte bei Infektionen von 'Jo-

jo' mit beiden PPV-Stämmen beobachtet werden. Im Falle von PPV-M setzte die Phenolakkumulation nicht früher ein als bei PPV-D, sie schritt aber rascher fort, und die Rindenspäne wurden schneller abgestoßen als bei PPV-D. 'K4' reagierte nur nach Inokulation mit PPV-M wie 'Jojo', bei Inokulation mit PPV-D wurde das Chip vom Gewebe der Sorte 'K4' nur sehr selten abgestoßen. Bei 'Ortenauer' konnte nur nach Inokulation mit PPV-M und auch dann nur sehr selten eine Phenolakkumulation festgestellt werden (s. Tab. 3.1–1).

Diskussion

FRASER (1987) zählt die Akkumulation von Phenylpropanoiden zu den ersten Ereignissen nach dem Auslösen der HR: Zunächst kommt es zu einer Erhöhung der PAL-Aktivität und einem nachfolgenden ersten Anstieg der Phenylpropanoidkonzentration in den Zellen. Sobald Nekrosen sichtbar werden, laufen die katalytischen Prozesse des Shikimatwegs verstärkt ab, und es kommt zu einem zweiten Anstieg der Phenolkonzentration. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass bei der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV ähnliche Prozesse ablaufen. Phenolinklusiven konnten ausschließlich im hypersensiblen Genotyp nachgewiesen werden, nicht im Gewebe der PPV-sensiblen Sorte, außerdem nicht oder nur äußerst selten in Gewebe der Sorte 'Ortenauer'. Absterbende Zellen wurden stets neben Zellen gefun-

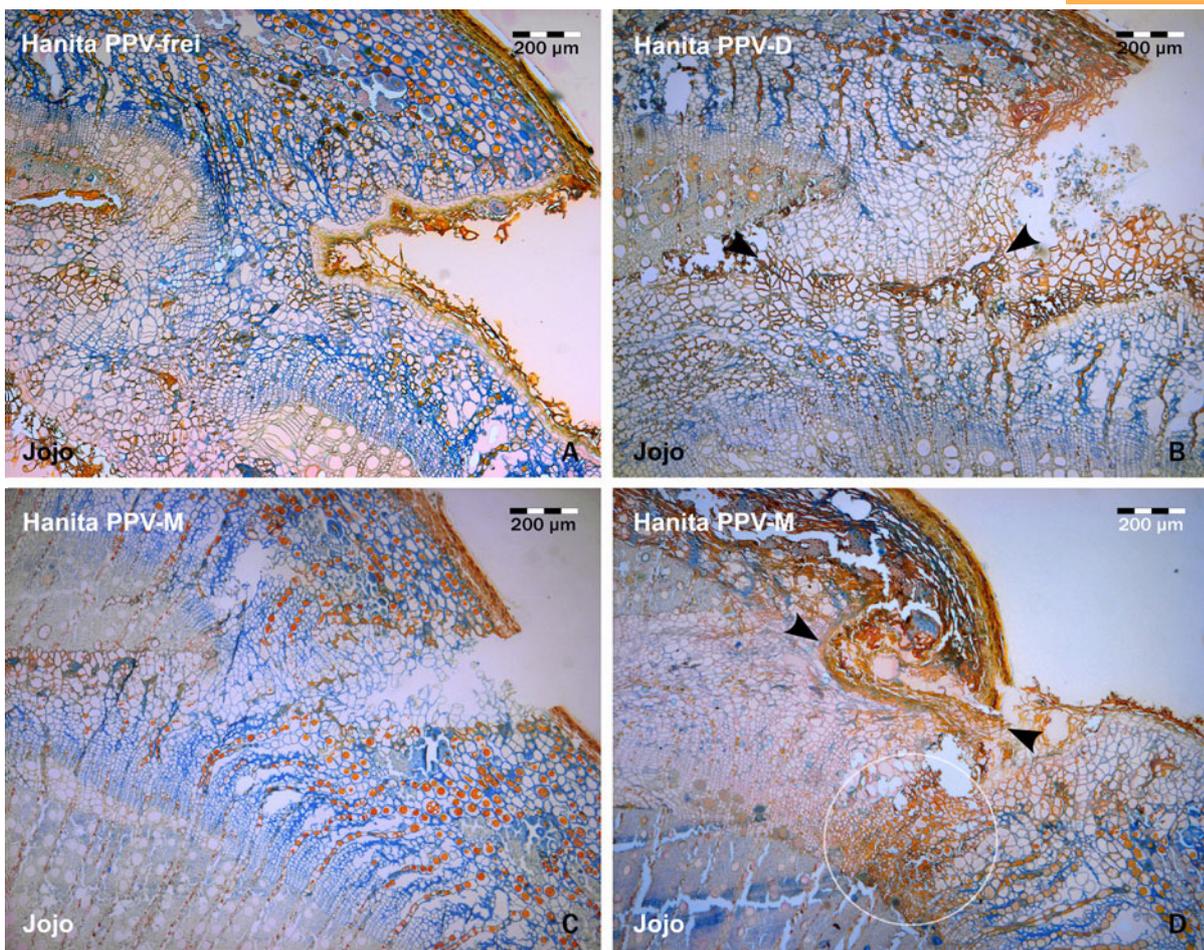


Abb. 3.1–2 Histologische Schnitte durch die Veredlungsstelle (Rindenspan der Sorte 'Hanita' auf 'Jojo'). ACN-Färbung. **A** 'Hanita' virusfrei (Kontrolle), sechs Wochen nach der Veredlung: ungestörte Verwachsung der Veredlungspartner. **B** 'Hanita' PPV-D, sechs Wochen nach der Veredlung: Eine nekrotische Linie durchzieht das junge Gewebe im Veredlungsspalt (Pfeile). **C** 'Hanita' PPV-M, 17 Tage nach der Veredlung: Der Veredlungsspalt ist gefüllt mit undifferenziertem Gewebe, es sind keine Abnormalitäten erkennbar. **D** 'Hanita' PPV-M, sechs Wochen nach der Veredlung: Der Rindenspan ist durch eine Zone nekrotischen, abgestorbenen Gewebes (Pfeile) vom Veredlungspartner abgeschottet. Er wurde vom Veredlungspartner abgestossen und ist abgestorben. In einigen Gewebebereichen von 'Jojo' häufen sich Phenylpropanoide an, Zellen degenerieren (Kreis).

den, die hohe Phenolgehalte aufwiesen. Der Anstieg der Phenolkonzentration ging dem Zelltod voraus.

Die Akkumulation von Phenylpropanoiden und das Absterben von Zellverbänden trat in jedem Fall erst einige Wochen nach der Verwachsung der beiden Veredlungspartner und damit eine lange Zeitspanne, nachdem Zellen des hypersensiblen mit Zellen des virusinfizierten Genotyps in engen Kontakt gekommen waren, auf. Dabei wäre davon auszugehen, dass die HR nach Pathogenkontakt rasch ausgelöst wird (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996). Wenn die be-

obachteten Vorgänge bei der Europäischen Pflaume eine HR darstellen, so ist nach der Ursache für das zeitverzögerte Einsetzen des Zelltods zu suchen.

Viren verbreiten sich in der Wirtspflanze über Plasmodesmata und über Leitgefäße, insbesondere das Phloem (KLUGE 1995). Meristematisches Gewebe ist in vielen Fällen in zwei Felder unterteilt: ein zentrales Feld und ein umgebendes peripheres Feld. Zellen eines Feldes sind miteinander über Plasmodesmata verbunden, nicht aber die angrenzenden Zellen der beiden verschiedenen Felder (ZAMBRYSKI und CRAWFORD

2000). Diese Barriere könnte ein Grund dafür sein, dass meristematische Gewebe virusfrei sind. Natürlich spielt dabei auch die hohe Zellteilungsrate eine Rolle: Die Zellen teilen sich schneller, als sich die Viren von Zelle zu Zelle ausbreiten können (DREWS et al. 2004).

An der Veredlungsstelle bildet sich nach der Veredlung aus teilungsfähigen, meist kambialen Zellen undifferenziertes, kallusartiges Wundgewebe, und zwar ausgehend von beiden Veredlungspartnern (HARTMANN et al. 1997). Voraussetzung dafür ist die Bildung neuer Meristeme (YEOMAN und BROWN 1976). Es kann in Analogie zu den geschilderten Begebenheiten bei Zellen im meristematischen Gewebe von Sprossspitzen angenommen werden, dass die sich daraus bildenden Zellen zunächst nicht sämtlich untereinander über Plasmodesmata verbunden sind, sondern dass symplastische Verbindungen zumindest auf bestimmte Gewebebereiche beschränkt sind, wodurch die Einwanderung von Viren in das Gewebe im Veredlungsspalt in der Anfangsphase des Verwachsungsprozesses behindert ist. Nachgewiesen ist, dass zwischen den Geweben der beiden Veredlungspartner, die ja aus unterschiedlichen meristematischen Bereichen entstehen, anfänglich keine symplastische Verbindung besteht; diese wird erst hergestellt, indem sekundäre Plasmodesmata zwischen angrenzenden Zellen der Veredlungspartner gebildet werden, nachdem die Kallusbrücke den Veredlungsspalt ausgefüllt und ein enger Kontakt zwischen den Zellen der beiden Veredlungspartner hergestellt ist (JEFFREE und YEOMAN 1983, KOLLMAN und GLOCKMANN 1991). Die Ausbildung der sekundären Plasmodesmata erfolgt nicht synchron in allen Zellen, die in der Kontaktebene der beiden Zellen unterschiedlichen genetischen Ursprungs liegen; zuerst werden sie in Bereichen angelegt, in denen sich später Leitbündel differenzieren.

Aus dieser Sicht werden die im Versuch beobachteten Vorgänge verständlich: Bis Scharkaviren in das neu gebildete Gewebe im Veredlungsspalt eindringen können, muss zuerst eine kontinuierliche Verbindung über Plasmodesmata zwischen den Zellen, die aus dem virusinfizierten Rindenspan gebildet wurden, und zwischen

diesen und den Zellen des hypersensiblen Genotyps geschaffen werden. Deshalb setzen die Akkumulation von Phenylpropanoiden im Veredlungsspalt und der Tod von Zellen des hypersensiblen Genotyps erst eine gewisse Zeit nach dem Ausfüllen des Veredlungsspalts mit Kallusgewebe ein. Zudem erfolgt dies nicht völlig gleichmäßig an der Grenzfläche zwischen den Geweben der beiden Veredlungspartner, da zum einen die Plasmodesmata nicht synchron gebildet werden und zum anderen die Verbreitung des Virus im pflanzlichen Gewebe grundsätzlich ungleichmäßig ist (s. Kapitel 1.3.1.8 „Verteilung des Virus in der Pflanze“ auf S. 9).

Die nekrotische Linie, die sich im Veredlungsspalt bei Kombinationen hypersensibler und scharkainfizierter, sensibler Genotypen bildete, kann als Ursache für das Absterben der Chips im vorliegenden Versuch angesehen werden. Hiermit kann aber auch das Verhalten hypersensibler Edelsorten im Doppelpfropfungs-testsystem erklärt werden (s. Kapitel 2.1 „Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften“ auf S. 42): Diese trieben zunächst aus, zeigten nach einer Phase normalen Triebwachstums plötzlich Welkeerscheinungen und starben nachfolgend ab. In der Phase, in der noch keine Viren in den Veredlungsspalt einwandern konnten, ist ein ungestörter Austrieb des Edelreises möglich. Erst nachdem an der Kontaktfläche der beiden Veredlungspartner eine HR abläuft, auf diese Weise eine nekrotische Linie entsteht und den Stofftransport zwischen den Veredlungspartnern unterbindet, stirbt das Reis ab. Können sich Phloemgefäße zwischen den Veredlungspartnern vor dem Einwandern der Viren in entsprechende Bereiche des Veredlungsspalts ausdifferenzieren, so ist über diese Verbindungen ein Langstreckentransport der Viren von der infizierten Unterlage in das Edelreis möglich. Diese treten erst dort, wo Phloementladung stattfindet, wieder aus dem Gefäßsystem aus. Dies erklärt die Bildung von Rinden- und Blattspreitennekrosen und das Auftreten von Triebspitzendürre ohne vollständiges oder mit verzögertem Absterben des Edelreises.

Die Sorte 'Jojo' reagierte gegenüber beiden getesteten PPV-Stämmen mit der Akkumu-

lation von Phenolen, dem Zelltod an der Veredlungsstelle und dem Abstoßen der Rindenspäne. Bei 'K4' war dies nur bei Inokulation mit PPV-M der Fall. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den von KEGLER et al. (1985), PETRUSCHKE und SCHRÖDER (1999) und GRÜNTZIG et al. (2001) geschilderten Beobachtungen auf makroskopischer Basis.

Die Ausbildung der nekrotischen Linie erfolgte bei der Sorte 'Jojo' nach Inokulation mit PPV-M schneller als mit PPV-D. PPV-M gilt allgemein als aggressiverer Stamm als PPV-D; er breitet sich in der Obstanlage in kürzerer Zeit aus (KEGLER et al. 1998, s. Kapitel 1.3.1.4 „Virusstämme“ auf S. 6).

Die Sorte 'Ortenauer' ist als hoch sensibel (also sehr schwach hypersensibel) gegenüber PPV einzustufen und nicht in der Lage, das Virus abzuwehren (HARTMANN 1990). Dies wird mit den vorliegenden Untersuchungen bestätigt: Im Veredlungsspalt bildete sich keine nekrotische Linie, nur sehr vereinzelt akkumulierten Phenyl-

propanoide in den Zellen. Zelltod konnte nicht beobachtet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine Hypersensibilitätsreaktion der Genotypen 'Jojo' und 'K4' gegenüber dem Scharkavirus hin. Erstmals konnte die HR, begleitet von der Akkumulation von Phenylpropanoiden, auf mikroskopischer Ebene nachgewiesen werden. Damit lassen sich Erscheinungen wie das Abstoßen virusinfizierter Edelreiser oder Rindenspäne nach Veredlung auf hypersensible Genotypen und die Absterberscheinungen an hypersensiblen Hybriden nach Veredlung auf PPV-infizierte Pflanzen erklären. Zudem wird verständlich, dass es einen Transport von Viren aus scharkakranken Bäumen in aufveredelte Reiser hypersensibler Genotypen geben kann, wenn durch die Veredlungsstelle hindurchreichende Phloemverbindungen ausdifferenziert wurden, ehe das Virus ins Gewebe, das den Veredlungsspalt ausfüllt, eindringen und dort eine HR hervorrufen konnte.

3.2 Akkumulation von HR-Indikatoren in der Blattspreite

Um die HR der Europäischen Pflaume gegenüber PPV nachzuweisen, wurde untersucht, ob sich nach Inokulation mit PPV verschiedene biochemische Indikatoren für die HR in der Blattspreite verschiedener Genotypen anhäufen.

3.2.1 Superoxidanionen in Mesophyllzellen der Sorte 'Jojo' nach künstlicher Inokulation

Zielstellung. Unter natürlichen Inokulationsbedingungen bleibt die Sorte 'Jojo' PPV-frei. Makroskopisch sind nach PPV-Inokulation durch Blattläuse am gesamten Sprosssystem keine Veränderungen feststellbar. Ziel war es, die natürliche Inokulation mittels Blattläuse zu simulieren und Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen der Blattspreite histochemisch zu untersuchen. Als Indikator für die HR wurde die Akkumulation von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) verwendet. $O_2^{\cdot-}$ zählt zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die im Laufe der HR in hohen Konzentrationen in der Zelle auftreten und den *oxidative burst* verursachen (s. Kapitel 1.5.1.3 „Auslösung der HR und genetische Grundlagen“ auf S. 35).

Material und Methoden

Pflanzenanzucht. Je fünf Edelreiser der hypersensiblen Sorte 'Jojo' und der PPV-sensiblen Sorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' wurden Anfang Februar 2004 auf virusfreie Myrobalanensämlinge veredelt. Die Pflanzen wurden in Torf-Tonsubstrat getopft und im beheizbaren Foliengewächshaus der Versuchsstation für Gartenbau aufgestellt (Veredlungsmethode, verwendetes Substrat und Temperaturregime s. S. 42f.). Bei der Kultur der Pflanzen wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, die Pflanzen durch mehrfache Akarizidspritzungen frei von Weichhautmilben zu halten. Ende Mai wurden den Pflanzen die drei jüngsten voll entfalteten Blätter entnommen und für die nachfolgend genannten Untersuchungen verwendet. Dabei wurde darauf ge-

achtet, dass die letzte Akarizidapplikation mehr als 10 Tage zurücklag.

Extraktion von virushaltigem Pflanzenpresssaft. Topfkulturen der Sorte 'Felsina' (aus Gewächshauskultur der Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart), die mit dem Scharkaisolat 'Cacak NP' infiziert waren, wurden scharkasymptomtragende Blätter entnommen. Die Mittelrippe der Blätter wurde entfernt, und 2,2g der Blattspreitenhälften wurden in wenigen Millilitern Inokulationspuffer (0,07M Phosphatpuffer (pH 8,0) mit 20g/l Polyvinylpyrrolidon (M: 10000 – 15000g/mol) und 2g/l Natriumsulfit) in ein bis zwei Millimeter breite Streifen geschnitten, gemörsert und mit Inokulationspuffer auf ein Volumen von 50ml aufgefüllt. Nach zwei Minuten Standzeit wurde die Suspension dekantiert und zum Überstand, der im weiteren Verlauf Verwendung fand, 25ml Inokulationspuffer gegeben. Auf gleiche Weise wurden Blätter virusfreier Pflanzen der Sorte 'Felsina' behandelt (Kontrolle).

Inokulation mit PPV. Sprossspitzen und die drei jüngsten voll entfalteten Blätter der drei oben genannten Sorten wurden unmittelbar nach dem Abschneiden von der Pflanze in virushaltigen Inokulationspuffer getaucht und darin schonend exsikiert. Die aus dem Mesophyll entweichende Luft wurde so durch die umgebende Virussuspension ersetzt. Nach fünf Minuten bei 200mbar wurde der Unterdruck vorsichtig abgebaut, die Sprossspitzen und Blätter wurden entnommen und kurz mit entionisiertem Wasser gespült. Anschließend wurden sie in Kunststoffpetrischalen überführt, in denen mit Leitungswasser angefeuchtetes Filterpapier ausgelegt war. Während der Prozedur wurde wie auch in allen nachfolgenden Schritten darauf geachtet, dass die Blätter nur am Blattstiel mit der Pinzette berührt wurden und keinerlei Druck auf die Blattspreite ausgeübt wurde. Die mit dem Deckel verschlossenen Petrischalen wurden, beginnend um 11 Uhr, im Klimaschrank aufgestellt. Von 11 bis 22 Uhr wurde die Temperatur im Klimaschrank auf 25°C eingestellt, und es wurde über Leuchtstoffröhren be-

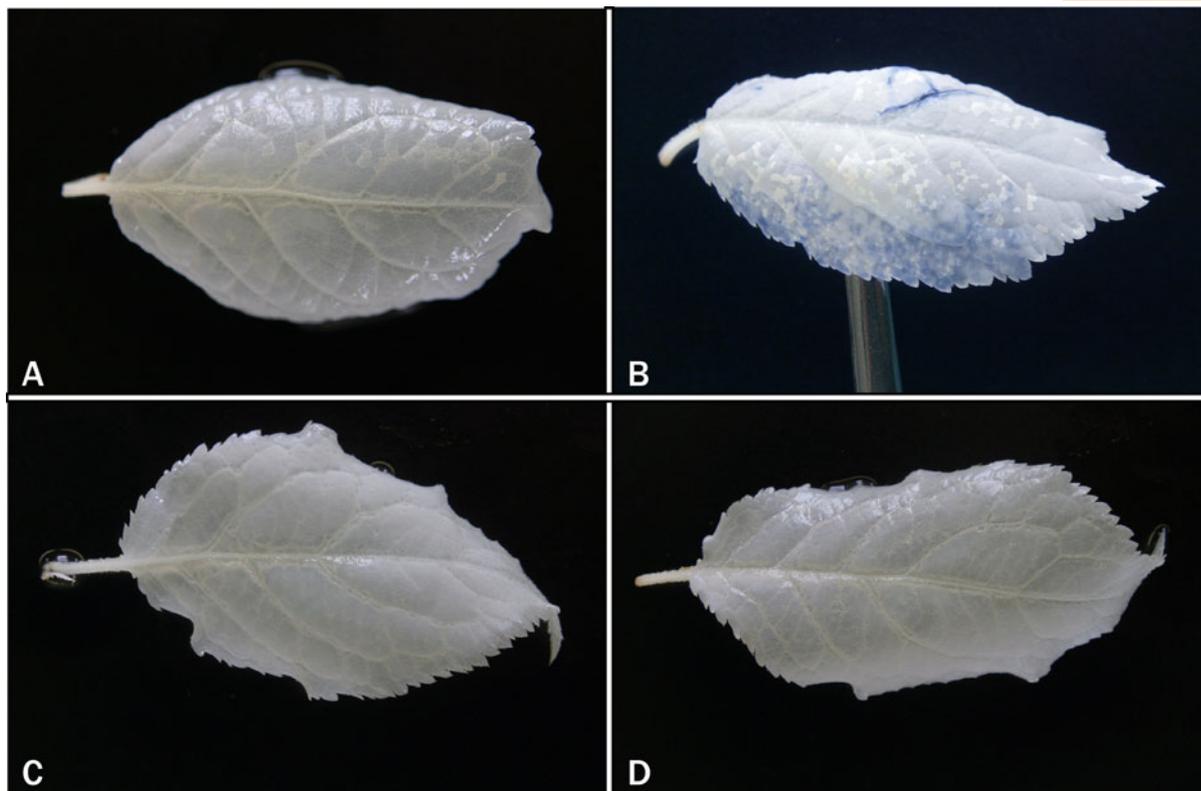


Abb. 3.2-1 Nachweis von Superoxidanionen mit NBT in der Blattspreite der Sorten 'Jojo' und 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' nach künstlicher Inokulation mit PPV (Aufenthaltsdauer im Klimaschrank: 21 h). **A** 'Jojo', Kontrolle (Inokulation in virusfreiem Pflanzenpresssaft). **B** 'Jojo', Inokulation in virushaltigem Pflanzenpresssaft. **C** 'Hauszwetsche, Typ Schüfer', Kontrolle. **D** 'Hauszwetsche, Typ Schüfer', Inokulation in virushaltigem Pflanzenpresssaft. Blaufärbung, die in Gegenwart von Superoxidanionen durch Reduktion von NBT entsteht, tritt nur bei 'Jojo' nach Inokulation mit virushaltigem Pflanzenpresssaft auf.

lichtet. Von 22 bis 6 Uhr standen die Blätter bei 15°C im Dunkeln, danach herrschte wieder die höhere Temperatur und es wurde belichtet. Nach 21, 27 und 32 Stunden im Klimaschrank wurden jeweils drei Blätter der einzelnen Varianten entnommen und auf das Vorkommen von Superoxidanionen untersucht.

Nachweis von Superoxidanionen. Die aus dem Klimaschrank entnommenen Blätter wurden in Lösung mit 0,1 g/l Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (in 25 mM K-HEPES [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethan-sulfonsäure]-Puffer mit 50 mM Trikaliumphosphat (K_3PO_4), pH 7,6, beschrieben von HÉRNANDEZ et al. 2001) überführt und wiederum für fünf Minuten schonend Unterdruck von 200 mbar angelegt. NBT wird in Gegenwart von O_2^- reduziert und fällt am Ort der Reduktion als unlösliches, blaues Formazan aus (DOKE und OHASHI 1988). Die Blätter verblieben

in der Lösung und wurden für sechs Stunden im Klimaschrank bei 25°C und Belichtung aufgestellt. Anschließend wurden die Blätter zum Abstoppen der Stoffwechselreaktionen und zum Bleichen in Ethanol-Eisessig (Mischungsverhältnis 3:1) gelegt. Nach einer Stunde wurden die Blätter in Ethanol (96%) überführt. Das Ethanol wurde nach einer weiteren Stunde erneuert. Die so vollständig gebleichten Blätter wurden visuell auf Blaufärbung hin untersucht. Zudem wurden Gewebestücke jeder Variante in Kunstharz eingebettet und davon Semidünnschnitte angefertigt (s. S. 43f.). Die polysaccharidhaltigen Zellwände der Präparate wurden mit der Perjod-Schiff-Reaktion rötlich angefärbt. Dazu wurden die Schnitte für fünf Minuten in Perjodsäurelösung (5 g/l) inkubiert, danach mit destilliertem Wasser sorgfältig gespült und für zwei Minuten in Schiffches Reagenz (Merck) überführt. Die Schnitte wurden nach der Herstellung von Dauerpräpara-

ten wie auf S. 45 beschrieben mikroskopisch ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussion

Eine Blaufärbung der Blattspreite nach der Inkubation mit NBT-Lösung trat bei einem 21-stündigen Aufenthalt der Blätter im Klimaschrank nur bei der Sorte 'Jojo' nach Inokulation mit virushaltigem Pflanzenpresssaft auf. In allen anderen Fällen blieb die Blattspreite ungefärbt (s. Abb. 3.2-1). Bei einer Verweildauer von 27 Stunden im Klimaschrank zeigte sich das gleiche Bild. Verblieben die Blätter dort 32 Stunden, färbten sich dagegen die Blattspreiten aller Sorten und unabhängig von der Inokulation in virusfreiem oder virushaltigem Pflanzenpresssaft stark blau. Reaktive Sauerstoffspezies wie $O_2^{\cdot-}$ werden nach einer Vielzahl abiotischer und biotischer Stressfaktoren in pflanzlichen Zellen gebildet (ELSTNER et al. 1996). Blätter, die von der Mutterpflanze abgetrennt werden, sind einem derartigen Stress ausgesetzt, so dass nach einer gewissen Zeitspanne, im vorliegenden Fall ca. 30 Stunden, die massive Bildung von Superoxidanionen einsetzt, welche nicht als Reaktion der Pflanze auf Inokulation mit Viren angesehen werden kann. In Vorversuchen konnten zudem einige weitere Einflussfaktoren definiert werden, die einen Einfluss auf die Bildung von ROS in Blättern der untersuchten Genotypen haben. So führte selbst schwacher Befall mit Weichhautmilben oder die Applikation verschiedener Pflanzenschutzmittel kurz vor Entnahme der Blätter zu einer starken Blaufärbung in allen Varianten. Wurden die Blattspreiten mit Pinzetten oder anderen Werkzeugen berührt, färbten sich die Druckstellen ebenfalls blau, weshalb die Überführung der Blätter in die und aus den Inkubationslösungen sehr vorsichtig erfolgte.

Demzufolge lassen sich im verwendeten Testsystem nur Ergebnisse aus den Varianten mit kürzerer Inkubationszeit in NBT-Lösung als 27 Stunden hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen PPV-Inokulation und Reaktion der Pflanze interpretieren. Dabei fällt auf, dass nur die Sorte 'Jojo' nach Inokulation mit PPV-haltigem Pflanzenpresssaft eine Blaufärbung zeigte und damit lediglich in diesem Fall eine Akkumulation von

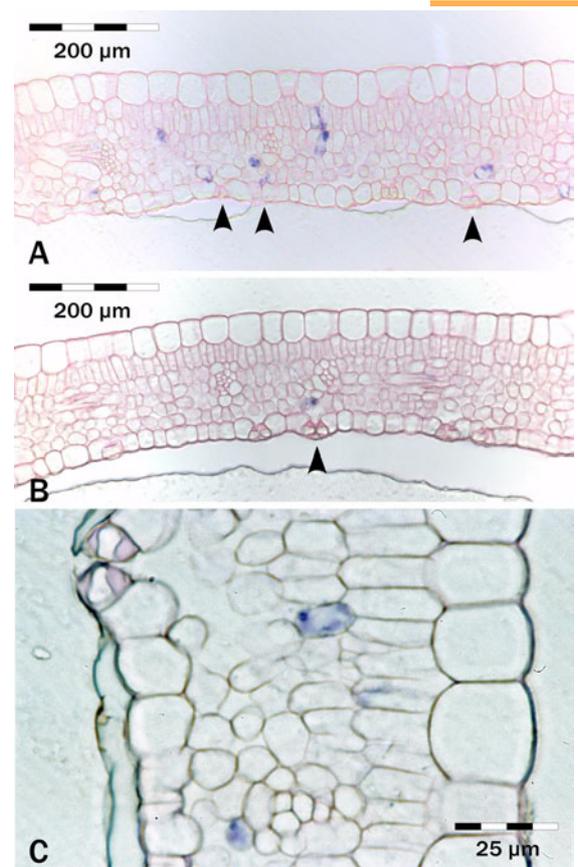


Abb. 3.2-2 Semidünnschnitt durch die Blattspreite von 'Jojo' nach dem Nachweis von Superoxidanionen (nach PPV-Inokulation durch virushaltigen Pflanzenpresssaft, Aufenthaltsdauer im Klimaschrank: 21 h). Einige Stomata sind mit Pfeilen markiert. Einzelne Zellen akkumulieren $O_2^{\cdot-}$; bevorzugt liegen diese in Mesophyllbereichen, die an die stomatären Höfe angrenzen. **A/B** gefärbt mit Perjud-Schiff-Reaktion, **C** ohne zusätzliche Anfärbung.

$O_2^{\cdot-}$ nachgewiesen werden konnte. $O_2^{\cdot-}$ wird eine entscheidende Rolle im Ablauf der HR zugeschrieben (WOJTASEK 1997, s. auch Kapitel 1.5.1 „Die pflanzliche Hypersensibilitätsreaktion“ auf S. 32). SCHRAUDNER et al. (1998) nutzten die Färbung mit NBT als Nachweis der Superoxidanionenakkumulation bei der Bildung von ozoninduzierten Läsionen bei Tabak, die einem HR-induzierten Zelltod glichen. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei den blaugefärbten Zellbereichen um solche handelt, in denen, ausgelöst durch PPV, eine hypersensible Reaktion abläuft.

Von Interesse ist zudem die Anzahl und die Anordnung der Zellen, in denen Superoxid-

anionen akkumulieren. Aufschluss darüber geben histologische Schnitte durch die Blattspreiten der verschiedenen Varianten. In Abb. 3.2–2 ist die Verteilung von Zellen, die $O_2^{\cdot-}$ anhäufte, bei 'Jojo' nach Inokulation mit PPV-haltigem Pflanzenpresssaft ersichtlich. (Bei allen anderen Varianten traten keine blau gefärbten Zellen auf.) Nur einzelne Zellen im Mesophyllgewebe sind blau gefärbt. Die Mehrzahl davon liegt im Bereich der stomatären Höfe. Dies kann mit der verwendeten Inokulationsmethode erklärt werden: Der PPV-haltige Pflanzenpresssaft wurde unter Anlegen von Unterdruck in das Blattgewebe eingeführt. Dabei entweicht über den Weg des geringsten Widerstands, die Spaltöffnungen, die im Mesophyll enthaltene Luft und wird durch umliegende, virushaltige Lösung ersetzt. Zellen im Bereich der stomatären Höfe treten am stärksten in Kontakt mit der einströmenden Virussuspension. Es ist daher naheliegend, dass eine HR vornehmlich in diesen Zellen ausgelöst wird. Dass nur in Einzelzellen $O_2^{\cdot-}$ akkumulierte, deutet darauf hin, dass eine HR nur durch Kontakt mit PPV ausgelöst wird und eine Antwort zellspezifisch erfolgt.

Auch in den Bereichen der Blattspreite, in denen visuell keine Blaufärbung beobachtet werden kann, treten einzelne blau gefärbte Zellen auf; deren Häufigkeit ist dort geringer (s. Abb. 3.2–2 A mit mehreren und B mit nur einer blau gefärbten Zelle). Dies kann daran liegen, dass in diesen Bereichen weniger virushaltige Lösung eingedrungen und damit die Wahrscheinlichkeit der Auslösung einer HR geringer war.

Die vorgestellte Methode kann als Simulation der natürlichen Infektion des Blattes über Blattläuse angesehen werden. Es kann angenommen werden, dass bei hypersensiblen Genotypen in einzelnen Zellen, die bei Probestichen von Blattläusen mit PPV in Kontakt kommen, eine HR ausgelöst wird. Der damit verbundene Zelltod beschränkt sich auf eine oder wenige benachbarte Zellen. So ist zu erklären, warum bei der Sorte 'Jojo' auch nach massiver Blattlausinokulation keine sichtbaren Nekrosen auftreten.

Experimentelle Ansätze mit Blattläusen als natürlichen Vektoren des Scharkavirus sind schwierig zu realisieren: Zum einen kann kaum nachgewiesen werden, ob während eines Ein-

stichs bei einer Probebohrung auf dem Blatt der Europäischen Pflaume tatsächlich Viren übertragen wurden. Zum anderen ist im Experiment nicht klar unterscheidbar, ob es aufgrund der Auslösung einer HR oder als Folge der mechanischen Schädigung der Zelle durch den Einstich der Blattlaus mit ihren Mundwerkzeugen zu einer Erhöhung der Superoxidanionenkonzentration kommt. Schließlich ist die Lokalisierung der Blattlauseinstichstellen auf der Blattspreite schwierig. Vor diesem Hintergrund erscheint die vorgestellte Methode als zuverlässiger.

3.2.2 Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid in der Blattspreite hypersensibler Genotypen

Zielstellung. Neben den stark hypersensiblen Zuchtklonen wie 'Jojo' gibt es Genotypen, die nach PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung keine raschen Absterbeerscheinungen zeigen (s. Kapitel 2.1 „Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften“ auf S. 42). Es sollte untersucht werden, ob es zwischen sensiblen Genotypen, die typische Scharkasymptome auf der Blattspreite ausbilden, und (schwach) hypersensibel reagierenden Genotypen, die mit Blattspreitennekrosen reagieren, Unterschiede in der Akkumulation von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen in den Blättern gibt. Diese Vertreter der ROS gelten als Indikatoren für den Ablauf der HR (HÜCKELHOVEN et al. 2000).

Material und Methoden

Für die Untersuchungen konnten nur Genotypen verwendet werden, die den HK 0 und 1 zuzuordnen waren. Genotypen mit stärker ausgeprägter Hypersensibilität reagieren nach Doppelpfropfung mit dem raschen Absterben der Blätter und Sprosse, so dass diese nicht für den histochemischen ROS-Nachweis verwendet werden konnten.

Pflanzenanzucht. Von den in Tab. 3.2–1 aufgeführten Zuchtklonen mit unterschiedlicher Reaktionsweise gegenüber PPV wurden im Januar 2004 wie in Kapitel 2.1 „Variabilität des Merk-

Tab. 3.2–1 Auf Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in der Blattspreite getestete Genotypen und ihre Reaktion nach PPV-Inokulation durch Doppelpfropfung

Genotyp	Symptome auf der Blattspreite
Katinka	Chlorosen
Hoh 6857	starke Chlorosen
Hoh 7099	Nekrosen
Hoh 7409	Nekrosen
Hoh 6736	Chlorosen und Nekrosen
Hoh 6557	starke Chlorosen und Nekrosen
Hoh 7558	starke Chlorosen und Nekrosen

mals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften“ auf S. 42 beschrieben Bäume angezogen. Im Juni 2004 wurden davon junge Blätter entnommen. Diese zeigten mitunter erst schwache Symptome der Reaktion auf PPV-Befall. Junge Blätter wurden gewählt, weil davon ausgegangen werden kann, dass eine hypersensible Reaktion bereits ausgelöst wird, bevor Nekrosen sichtbar werden. In jungen Blättern finden sich bei schwach hypersensiblen Genotypen (HK 1) sowohl kleinere nekrotische als auch visuell gesunde Bereiche.

Nachweis von Superoxidanionen. Je drei junge Blätter pro Genotyp wurden unmittelbar nach dem Abtrennen von der Pflanze in NBT-Lösung überführt. Die Vorgehensweise beim Nachweis der Superoxidanionen entspricht den Ausführungen auf S. 70.

Nachweis von Wasserstoffperoxid. Unmittelbar nach der Entnahme von der Pflanze wurden je drei junge Blätter pro Genotyp in Diaminobenzidin (DAB)-Lösung überführt (0,2g/l DAB in 50mM Tris-Acetat (pH 5), beschrieben in HERNANDEZ et al. 2001). Alle weiteren Schritte sind identisch mit dem Nachweisverfahren für Superoxidanionen, außer dass die sechsstündige Inkubation im Dunkeln stattfand. DAB polymerisiert in Gegenwart von H_2O_2 und wird als brauner Niederschlag sichtbar (THORDAL-CHRISTENSEN et al. 1997).

Teile der mit NBT und DAB behandelten Blattspreiten wurden in Kunstharz eingebettet,

Schnitte mit einer Dicke von 5 μ m angefertigt (s. S. 45) und die Zellwände entweder mit der Perjod-Schiff-Reaktion (s. S. 70) oder mit der Hämatoxylin-Färbung nach DELAFIELD (GERLACH 1969) gefärbt. Die Perjod-Schiff-Färbung wurde wegen des besseren Kontrastes zur Blaufärbung nach NBT-Behandlung vornehmlich beim $O_2^{\cdot-}$ -Nachweis angewandt, die einfacher durchzuführende Hämatoxylinfärbung hauptsächlich beim Nachweis von H_2O_2 . Nach der Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Schnitte mikroskopisch untersucht (s. S. 45).

Ergebnisse

In Blättern aller Genotypen, die mit nekrotischen Reaktionen auf PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung reagieren, konnte eine Blau- bzw. Braunfärbung bei den beiden Nachweisverfahren für $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 beobachtet werden. Hierzu zählten die Genotypen ‘Hoh 6736’, ‘Hoh 7099’, ‘Hoh 7409’, ‘Hoh 6557’ und ‘Hoh 7558’. Die Farbreaktionen traten nicht immer neben nekrotischen Bereichen auf der Blattspreite auf, sondern auch in visuell gesund erscheinendem Gewebe. Es ist davon auszugehen, dass dies diejenigen Bereiche des Blattes sind, die später nekrotisieren. Abb. 3.2–3 zeigt die Resultate des Tests mit DAB- und NBT-Färbung als Methoden zum Nachweis der genannten ROS. Bei der Sorte ‘Katinka’, die mit normalen Scharkasymptomen auf Befall mit dem Virus reagiert, und dem Genotyp ‘Hoh 6857’, der starke Chlorosen zeigt, traten weder eine Braun- noch eine Blaufärbung von Zellen auf. (Lediglich an den Schnittflächen der Blattspreite bildete sich eine blaue Linie, die auf die Verletzung der angeschnittenen Zelllagen zurückzuführen ist.) Die mit Blattspreitennekrosen reagierenden Genotypen zeigten eine deutliche Farbreaktion. Daher kann gefolgert werden, dass die Ausbildung von Chlorosen nicht oder zumindest nicht mit einer derart starken Erhöhung der H_2O_2 - und $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration einhergeht, dass sie mit den vorgestellten histochemischen Methoden erfasst werden könnte.

Wie am Beispiel des Genotyps ‘Hoh 7558’ besonders deutlich zu erkennen ist, häuften sich H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$ insbesondere in der Nähe von Blattadern an. Nicht alle Nekrosen waren von

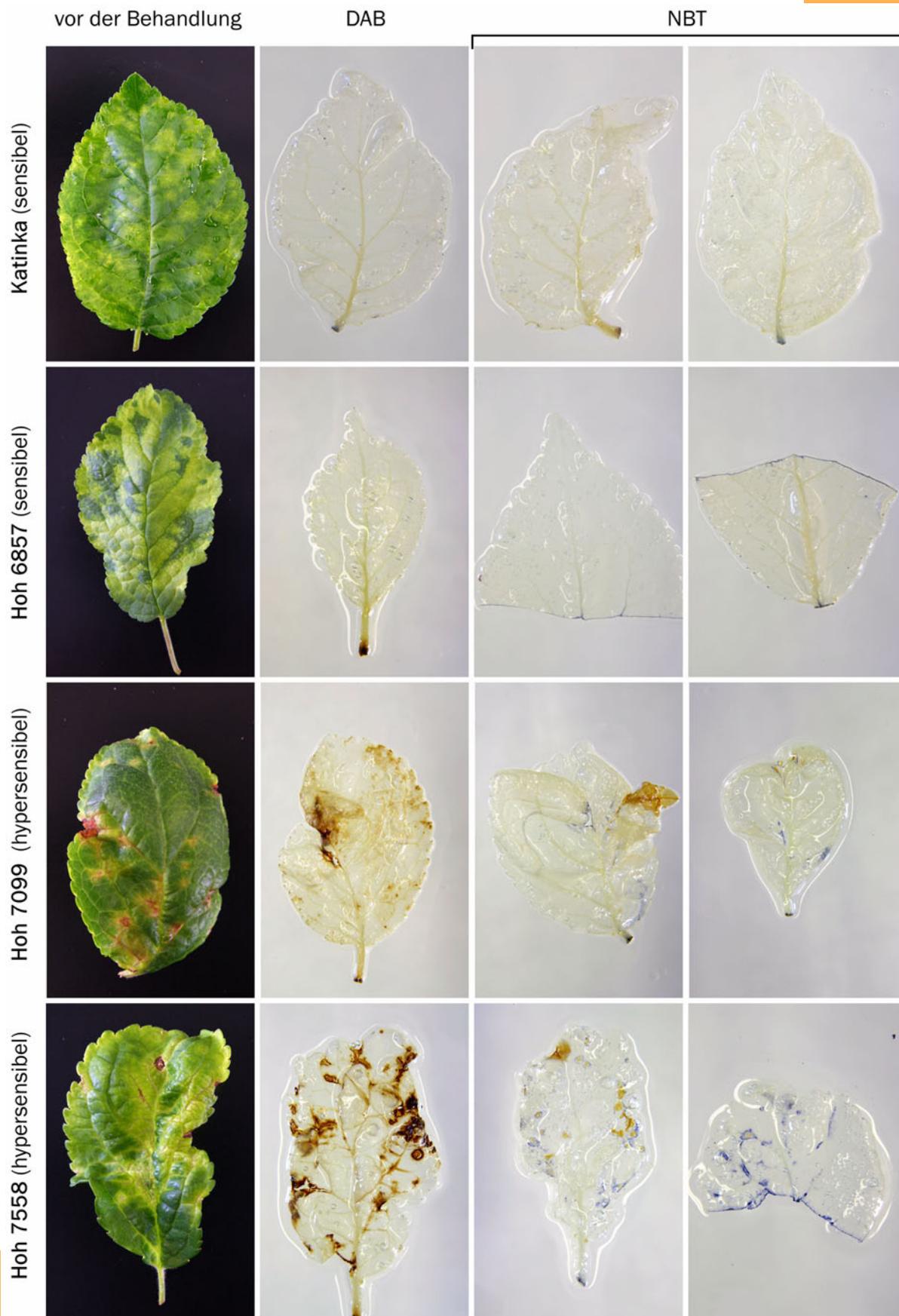


Abb. 3.2-3 Nachweis von ROS in virusinfizierten Blättern verschiedener Genotypen mit DAB und NBT.

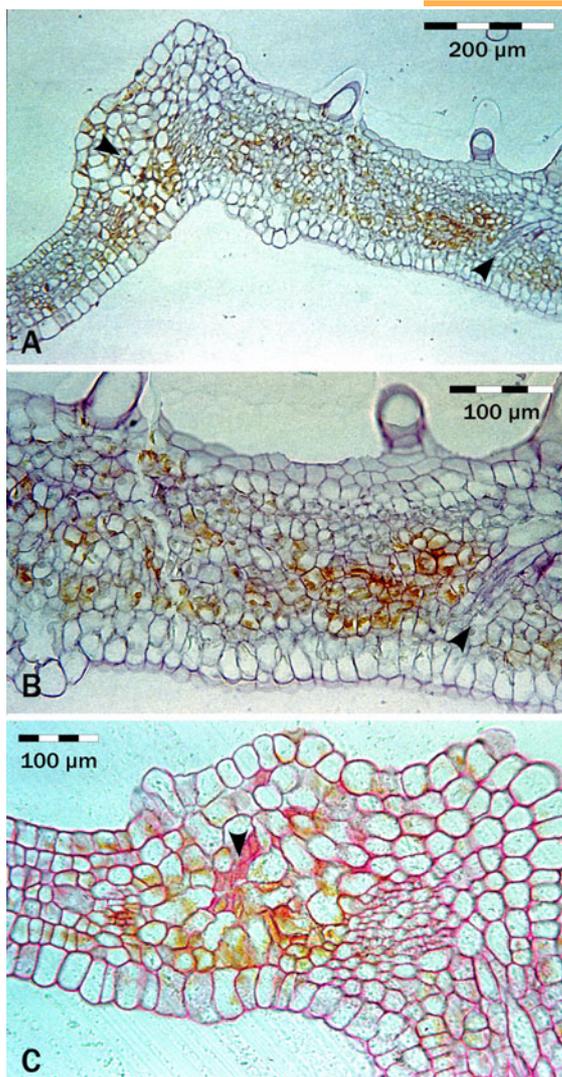


Abb. 3.2-4 Semidünnschnitte durch mit DAB behandelte Blattspreiten von Bäumen des Zuchtklons 'Hoh 7558', die durch Doppelpfropfung mit PPV infiziert worden waren. Besonders intensive Braunfärbung und damit eine starke H_2O_2 -Akkumulation trat in der Nähe von Leitgefäßen (Pfeile) auf. **A/B** Hämatoxylinfärbung. **C** Perjod-Schiff-Färbung.

Gewebebereichen mit Blaufärbung flankiert. (Für die Braunfärbung beim H_2O_2 -Nachweis kann diesbezüglich keine Entscheidung getroffen werden, da es nicht möglich ist, die Braunfärbung der Nekrosen eindeutig von derjenigen zu unterscheiden, die auf Polymerisierung von DAB zurückgeht.)

In Abb. 3.2-4 sind Schnitte durch die Blattspreite bei Genotypen mit Akkumulation von Wasserstoffperoxid gezeigt. Es fällt auch bei

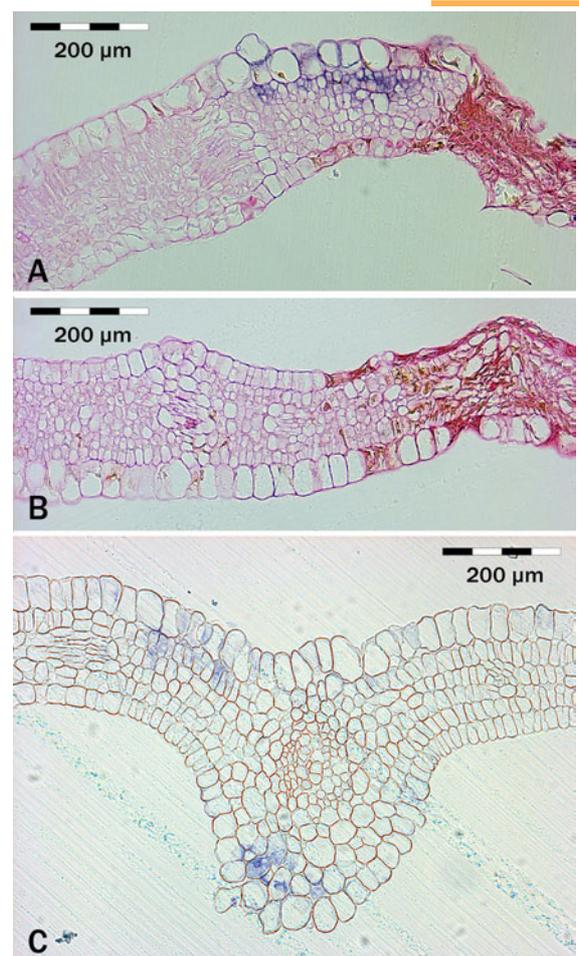


Abb. 3.2-5 Histologischer Nachweis von O_2^- mit NBT in Schnitten durch die Blattspreite hypersensibler Genotypen. Die Pflanzen waren durch Doppelpfropfung mit PPV infiziert worden. **A** Unmittelbar neben einem nekrotischen Bereich (rechts) färben Zellen blau ('Hoh 6736', Perjod-Schiff-Färbung). **B** Randbereich einer Nekrose ohne Blaufärbung von Zellen ('Hoh 6736', Perjod-Schiff-Färbung). **C** Im Bereich einer Blattader wird in Zellverbänden O_2^- nachgewiesen ('Hoh 7558', ohne zusätzliche Anfärbung).

den mikroskopischen Schnitten auf, dass die Zonen mit der stärksten Braunfärbung im Bereich von Leitgefäßen liegen. Die Viren werden in der Pflanze über lange Strecken vornehmlich im Phloem transportiert. Von dort aus gelangen sie über Plasmodesmata in angrenzende Zellen. Daher ist es verständlich, dass in phloemnahen Gewebebereichen eine stärkere H_2O_2 -Akkumulation auftrat. Die Braunfärbung betraf nicht einzelne Zellen, sondern stets ganze Zellbereiche. Dies kann mit dem Virustransport über plasmodesmatische Verbindungen erklärt werden.

Die Akkumulation von Superoxidationen wurde in den gleichen Genotypen und in den gleichen Gewebereichen nachgewiesen wie Wasserstoffperoxid. Abb. 3.2–5 zeigt Schnitte durch Blattspreiten der Genotypen 'Hoh 6736' und 'Hoh 7558' nach Färbung mit NBT. Wiederum ist bemerkenswert, dass sich $O_2^{\cdot -}$ nicht immer in Zellen, die an Nekrosen grenzen, anhäufte. Dies deutet darauf hin, dass die Pflanze in manchen Fällen in der Lage ist, die Verbreitung des Virus mit der hypersensiblen Abwehrreaktion zu unterbinden. Gelingt dies nicht, läuft in den Nekrosenrandbereichen eine HR ab, wodurch sich die Nekrose ausweitet. Genauso wie Wasserstoffperoxid akkumulieren Superoxidationen bevorzugt in Bereichen, die in der Nähe von Leitgefäßen liegen.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Blättern von Genotypen, die nach PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung mit Blattspreitennekrosen reagieren, eine scharkavirusbedingte HR abläuft: Nur in diesen Zuchtklonen sind die für die HR typischen ROS histochemisch nachweisbar. Mit sehr ähnlichen Methoden (NBT- und DAB-Färbung) wiesen HÜCKELHOVEN et al. (2000) pathogeninduzierten hypersensiblen Zelltod in Gerste nach. THORDAL-CHRISTENSEN et al. (1997) und VANACKER et al. (2000) verwendeten die DAB-Färbung ebenfalls für den Nachweis der HR bei der Gerste. DOKE und OHASHI (1988) nutzten die Färbung mit NBT zum Nachweis der virusinduzierten HR bei Tabak.

KEGLER et al. (2002) berichten, dass bei Nachkommen von 'K4' nicht alle Genotypen, die nach Doppelpfropfung mit Nekrosen auf der Blattspreite reagieren, zur Lokalisierung des Scharkavirus in der Lage sind. Die Autoren unterscheiden zwischen HR mit und ohne Lokalisierung des Schaderregers. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen ähnliche Begebenheiten bei Nachkommen der Sorten 'Jojo' und 'Ort×Stan 34': Nicht in allen Fällen stoppte die HR an den Rändern der Nekrosen. Mitunter zeigten angrenzende Zellverbände Anzeichen von HR. Dies ist dadurch zu erklären, dass in diesen Fällen das Virus im Bereich der Nekrose nicht ab-

geschottet und seine Replikation in angrenzenden Zellen nicht verhindert wird, sondern es sich dort vermehren und weiter ausbreiten kann. So löst es dort eine HR aus. Die Ausbreitung des Scharkavirus im Gewebe hypersensibler Genotypen wird in Kapitel 3.3 auf S. 81 näher behandelt.

3.2.3 Salicylat in der Blattspreite verschiedener Genotypen nach PPV-Inokulation

Zielstellung. Salicylsäure (salicylic acid, SA) akkumuliert in Geweben einer Vielzahl von Pflanzenarten, in denen eine hypersensible Reaktion abläuft. Wenngleich ihre Rolle bei der Auslösung und beim Ablauf der HR noch nicht widerspruchlos geklärt ist, gilt sie als ein Indikator für die HR (ALVAREZ 2000). Im Hinblick auf den Nachweis der HR der Europäischen Pflaume gegenüber PPV sollte untersucht werden, ob sich in der Blattspreite potentiell hypersensibel reagierender Genotypen der Europäischen Pflaume Salicylat anreichert.

Material und Methoden

Pflanzenanzucht. Je drei Pflanzen hypersensibler Genotypen verschiedener HK sowie sensible Zuchtklone wurden im Jahr 2004 wie in Kapitel 2.1 „Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften“ auf S. 42 beschrieben im Gewächshaus der Versuchstation für Gartenbau angezogen. Sie wurden durch Doppelpfropfung mit virusinfiziertem Zwischenveredlungsreis mit PPV-D infiziert. Als Kontrollen wurden virusfreie Veredlungen mit Myrobalanensämlingen als Unterlage unter gleichen Bedingungen wie die Doppelpfropfungen im Foliengewächshaus angezogen. In Tab. 3.2–2 sind die zur SA-Analyse verwendeten Genotypen und ihre Reaktion gegenüber PPV-Befall aufgeführt.

Salicylatbestimmung. Am 24.06. und 07.07.2004 wurden den virusinfizierten Pflanzen, die genotypspezifische Scharkasymptome zeigten, Blätter entnommen, ebenso den virusfreien Kontrollpflanzen symptomfreie Blätter. Pro Genotyp wurden fünf Blätter abgetrennt, die alle von einer

Tab. 3.2-2 Für die SA-Bestimmung verwendete Genotypen und ihre Reaktion auf PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung

Genotyp	Symptome auf der Blattspreite
Hauszwetsche, Typ Schüfer	Chlorosen
Katinka	Chlorosen
Hoh 6857	starke Chlorosen
Hoh 7199	leichte bis mittelstarke Nekrosen
Hoh 6774	leichte Nekrosen
Hoh 7558	starke Chlorosen und Nekrosen
Hoh 6213	starke Chlorosen und starke Nekrosen
Hoh 4517	sehr starke Nekrosen, Absterben

Pflanze stammten. Die Blätter wurden in 1 cm breite Streifen geschnitten und eine Mischprobe von 1 g zusammengestellt. Die Extraktion erfolgte nach der von ROTH (2004) beschriebenen Methode zur Salicylatextraktion bei Tabak: Die Blätter (1 g) wurden mit 0,9 g Seesand in flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach kurzem Auftauen wurde nochmals Stickstoff hinzugegeben und erneut gemörsert. Das Homogenisat wurde unter Zugabe von zweimal 3 ml Methanol p. a. (90%) in Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 4°C und 20000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen 50 ml-Rotationsverdampferkolben überführt. Das Pellet im Röhrchen wurde in 2 ml Methanol (90%) resuspendiert, erneut zentrifugiert und mit dem Überstand aus der ersten Zentrifugation vereinigt. Der Extrakt wurde im Rotationsverdampfer bei 45°C und 150 mbar auf ein Volumen von ca. 2 ml eingengt. Anschließend wurden 1 ml Methanol (100%) und 100 µl Trichloressigsäure (5%) zugegeben und geschüttelt. Die Suspension wurde in einen 5 ml-Messkolben überführt, mit 2 ml zweifach destilliertem Wasser nachgespült und der Messkolben mit zweifach destilliertem Wasser auf 5 ml aufgefüllt. Die Probe wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und für zehn Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neuen Reaktionsgefäßen bei 4°C für längstenfalls zehn Tage bis zur Analyse gelagert. Für die Bestimmung der Konzentration an freier SA wurde ein Aliquot

entnommen und in HPLC-taugliche Vials überführt.

Die Konzentration der SA in den Proben wurde mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt: Als Eluent wurde ein Gemisch aus Natriumacetat (20 mM, pH 4,0) und Methanol (7:3) bei einem Fluss von 0,7 ml/min verwendet. Als Pumpe fand eine ternäre Niederdruckgradientenpumpe des Modells Varian ProStar 230 Verwendung (isokratisch, Druck 130 bar). Die Säule (Varian Polaris C18-Ether, 5 µm, Länge 250 mm, Durchmesser 4,5 mm) wurde im Säulenofen auf 30°C erwärmt. Detektiert wurde mit einem Jasco 1520S-Fluoreszenzdetektor mit einer Anregungswellenlänge von 304 nm und einer Emissionswellenlänge von 408 nm. Die Nachweisgrenze für SA lag bei 5 ng/ml (entspricht 10 ng SA/g Probeneinwaage). Die Messdaten wurden automatisch auf einen PC übertragen und mit dem Programm Varian Galaxie Chromatography Data System, Version 1.7.403.22, verarbeitet.

Ergebnisse

Abb. 3.2-6 zeigt exemplarisch ein HPLC-Chromatogramm. Salicylat wurde nach einer Retentionszeit von knapp zehn Minuten detektiert.

Beim Probenahmetermin am 24.06.2004 lagen die Salicylatgehalte in der Blattspreite bei den virusfreien Varianten je nach Genotyp zwischen 40 und 1900 ng/g, bei den PPV-infizierten zwischen 60 und 3900 ng/g Frischsubstanz (s. Abb. 3.2-7). 'Hauszwetsche, Typ Schüfer', 'Katinka', 'Hoh 6857', 'Hoh 7199' und 'Hoh 6774' wiesen sowohl in der PPV-Variante als auch in der Kontrollvariante sehr niedrige Gehalte an SA auf (43–365 ng/g). Die Unterschiede zwischen der PPV-Variante und der Kontrolle des jeweils gleichen Genotyps waren gering, lediglich 'Hoh 6774' zeigte in der PPV-Variante den sechsfachen SA-Gehalt gegenüber der Kontrolle.

Bedeutende Unterschiede in der SA-Konzentration in der Blattspreite traten bei den Genotypen 'Hoh 7558', 'Hoh 6213' und 'Hoh 4517' auf. In den PPV-Varianten aller drei Zuchtklone lag die Konzentration deutlich über 2800 ng/g. 'Hoh 7558' wies mit 3880 ng/g die höchste gemess-

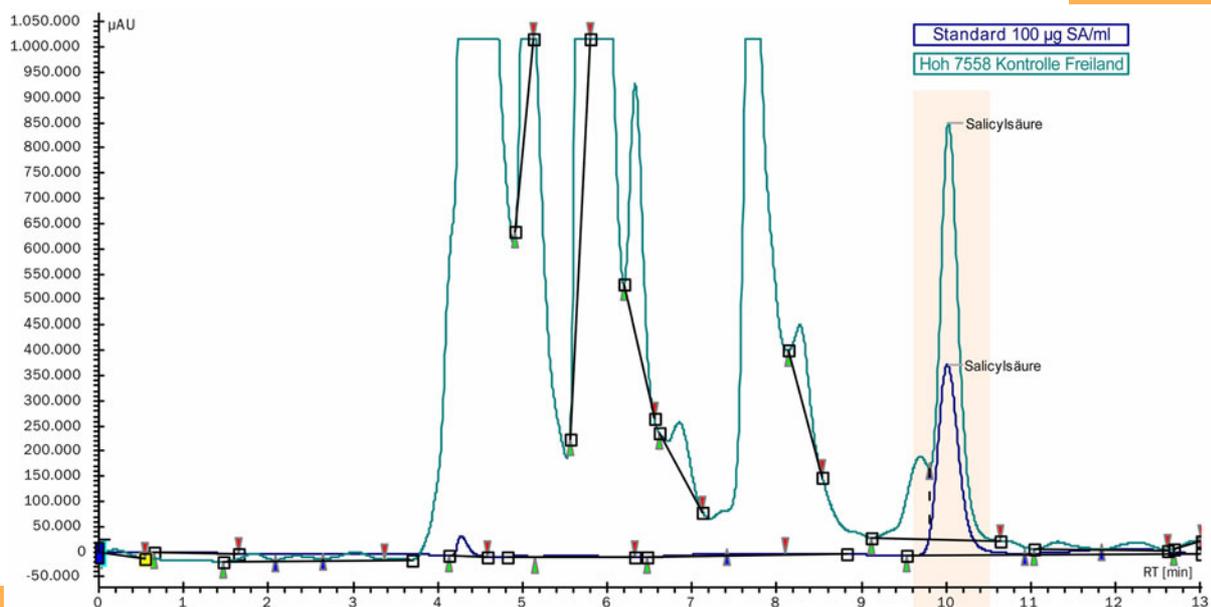


Abb. 3.2–6 HPLC-Chromatogramm. Detektion von Salicylat bei einer Retentionszeit von 9min 54sec. Dargestellt sind die Chromatogramme eines eingesetzten SA-Standards und des Genotyps 'Hoh 7558' in der virusfreien Variante.

sene SA-Konzentration aller Varianten auf. Bei 'Hoh 7558' und 'Hoh 6213' war der konstitutive SA-Gehalt (Kontrolle) hoch (ca. 1500 ng/g). Bei 'Hoh 4517' wurden dagegen in der virusfreien Variante nur 43 ng/g Salicylat gemessen.

Die Entnahme der Blattproben am 24.06.2004 erfolgte zum Abschluss der frühjährlichen Wachstumsphase der Gehölze. Die Triebspitzen bildeten die Terminalknospe aus. Bis zum zweiten Probenahmetermin am 07.07.2004 gab es keinen Blattzuwachs. Es gab kaum Veränderungen in der Ausprägung der scharkabedingten Symptome auf der Blattspreite.

Beim zweiten Probenahmetermin ergab sich ein ähnliches Bild wie beim ersten. Lediglich die Maximalwerte bei den PPV-infizierten Varianten der Genotypen 'Hoh 7558', 'Hoh 6213' und 'Hoh 4517' lagen niedriger. Außerdem wies 'Hoh 7199' wesentlich höhere SA-Konzentrationen auf als beim ersten Probenahmetermin.

Diskussion

Die PPV-anfälligen, sensiblen Genotypen 'Hauszweitsche, Typ Schüfer', 'Katinka' und 'Hoh 6857' – letzterer bildete sehr starke Chlorosen auf der Blattspreite aus – wiesen durchweg niedrige SA-Gehalte auf und zeigten keinen oder nur einen

geringen Anstieg in der PPV-infizierten Variante. Dies war zu erwarten, da in den Blättern dieser Genotypen keine HR abläuft.

Bei den hypersensibel reagierenden Genotypen konnte ein Unterschied zwischen sehr schwach hypersensiblen, die nur geringe Blattspreitennekrosen ausbildeten (Boniturstufen 1 und 2, 'Hoh 7199', Hoh 6774'), und stärker hypersensiblen mit Blattspreitennekrosen der Boniturstufen 4 und 5 ('Hoh 7558' und 'Hoh 6213') oder Triebspitzendürre ('Hoh 4517') festgestellt werden. Die schwach hypersensiblen Zuchtklone wiesen ähnlich niedrige SA-Konzentrationen wie die sensiblen auf. Lediglich 'Hoh 7199' bildete eine Ausnahme. In diesem Fall lagen beim zweiten Entnahmetermin sehr hohe SA-Konzentrationen vor. Da aber sowohl in der Kontrolle als auch in der PPV-Variante ein starker Anstieg erkennbar war, muss diese Erhöhung auf andere als PPV-bedingte Effekte zurückzuführen sein.

Die drei am stärksten hypersensibel reagierenden Genotypen zeichneten sich durch eine sehr hohe SA-Konzentration in der PPV-Variante aus. Die Werte lagen in allen Fällen deutlich über denjenigen der Kontrolle. Somit konnte eindeutig die Akkumulation von Salicylat in gegenüber PPV hypersensibel reagierenden Genotypen

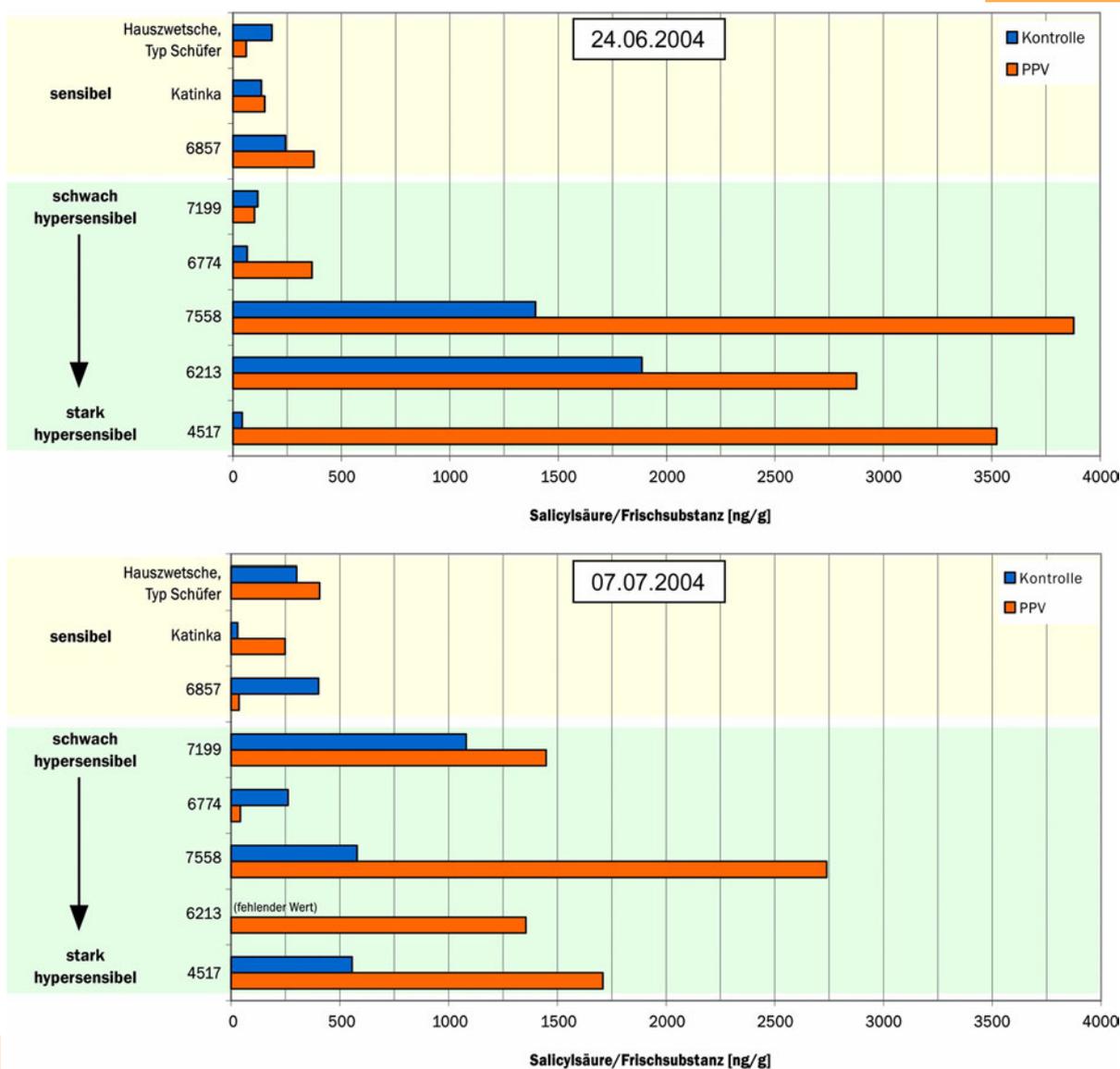


Abb. 3.2-7 Salicylat-Gehalte in den Blattspreiten der einzelnen Genotypen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Probenahme.

nachgewiesen werden. Die gemessenen Konzentrationen an freier SA entsprechen den Werten, die bei Tabak nach Auslösung der HR durch Inokulation mit Tabakmosaikvirus induziert wurden (ROTH 2004), oder übertreffen sie sogar. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei den beobachteten nekrotischen Reaktionen von Genotypen der Europäischen Pflaume um eine HR handelt. Da bei schwach hypersensiblen Genotypen keine Akkumulation in dem Ausmaß wie bei stark hypersensibel reagierenden festgestellt werden konnte, muss auch eine Rolle der SA als systemisches Signal in der Pflanze, das die Einleitung von Resistenzmechanismen gegen

das Pathogen bedingt, in Betracht gezogen werden. KLESSIG und MALAMY (1994), ALVAREZ (2000) und SLAYMAKER et al. (2002) halten eine derartige Funktion von SA für wahrscheinlich.

Die Konzentration von SA in der Blattspreite muss im Zeitverlauf nicht konstant sein: SA wird beispielsweise durch Methylierung oder Glycosidierung in biologisch inaktive Formen überführt. Dies ermöglicht es der Pflanze, die Funktion von Salicylat als Signalüberträger und als Effektor für Enzymaktivitäten in der Zelle zu steuern (SLAYMAKER et al. 2002). Ist die für die Auslösung der notwendigen Stoffwechselforgän-

ge notwendige Konzentration freien Salicylats in der Zelle erreicht, kann diese durch Konjugation gesenkt werden. Vor diesem Hintergrund sind die beobachteten Veränderungen in der SA-Konzentration beim zweiten Entnahmeterrin erklärbar.

3.2.4 Zusammenfassung

KEGLER et al. (1985) bezeichneten die Absterbeerscheinungen des Neuaustriebs, die bei Veredlungen des Genotyps 'K4' auf bestimmte PPV-befallene Pflanzen auftreten, allein aufgrund visueller Beobachtungen als hypersensible Reaktionen. Mit den durchgeführten Experimenten gelang es erstmals nachzuweisen, dass es sich dabei tatsächlich um eine HR handelt. Dazu wurden in drei verschiedenen Versuchsansätzen Indikatoren für die HR im Stoffwechsel ausgewähl-

ter Genotypen der Europäischen Pflaume nach Inokulation mit PPV nachgewiesen:

- 1 Superoxidanionen akkumulierten in der Blattspreite der hypersensiblen Sorte 'Jojo' nach künstlicher PPV-Inokulation, nicht aber in derjenigen PPV-sensibler Genotypen.
- 2 In der Blattspreite hypersensibler Genotypen häuften sich in Bereichen, die später nekrotisieren, oder in Nekrosenrandbereichen Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid an.
- 3 Freie Salicylsäure lag in Blattspreiten hypersensibler Genotypen nach PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung in deutlich höherer Konzentration vor als in PPV-freien Pflanzen.

3.3 Beobachtungen zur Begrenzung der Virusausbreitung durch die hypersensible Reaktion

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass es sich bei den nekrotischen Reaktionen, die bei bestimmten Genotypen der Europäischen Pflaume nach Inokulation mit PPV ablaufen, um eine hypersensible Reaktion handelt. Zugleich wurde festgestellt, dass es Unterschiede im Grad der Hypersensibilität gibt. *Per definitionem* impliziert die HR zwei Komponenten ihrer Wirkweise (s. S. 32): Den programmierten Zelltod und die Auslösung von Resistenzreaktionen im umliegenden und/oder entfernt liegenden Gewebe.

Der Ablauf des programmierten Zelltods ist mit dem Auftreten absterbender Zellen im Veredlungsspalt und in der Blattspreite hypersensibler Genotypen nach massiver, künstlicher PPV-Inokulation nachgewiesen. Schwieriger ist es, die mit der HR verknüpften Resistenzreaktionen im umliegenden Gewebe zu beschreiben. Ein möglicher Ansatzpunkt, diese über die Bestimmung der Salicylatkonzentration in der Blattspreite zu erfassen, wurde im vorhergehenden Abschnitt vorgestellt. Ein prinzipielles Problem stellt bei der Interaktion zwischen der Europäischen Pflaume und PPV die fehlende Möglichkeit dar, über die Inokulation durch Abreibung virenhaltigen Pflanzenpresssaftes auf Blätter die HR an einigen Organteilen der Pflanze einmal oder mehrmals nacheinander zu induzieren und in bestimmten Zeitabständen die auftretenden Veränderungen im Stoffwechsel zu erfassen. Im Testsystem ist nur eine Inokulation durch Veredlung möglich, die eine stete Zufuhr an Inokulum mit sich bringt und daher die zeitlichen Dimensionen der Resistenzinduktion verschleiert.

Ein gangbarer Weg, den Grad der mit der HR einhergehenden Resistenzinduktion zu erfassen, ist es, deren Effekt, d. h. die Hemmung der Virusausbreitung, nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden zwei Verfahren angewandt: Der immunologisch-histochemische Nachweis von PPV in Gewebeschnitten mittels Immunogold-Silverstainings und die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Virusausbreitung unter

Verwendung eines rekombinanten PPV-Isolats, das in den Wirtszellen ein fluoreszierendes Protein exprimiert. Die erstgenannte Methode musste zunächst für das System PPV/*Prunus domestica* entwickelt werden.

3.3.1 Virusnachweis mittels Immunogold-Silverstaining

Zielstellung. Die Ausbreitung des Scharkavirus in der Blattspreite sollte im Vergleich zwischen sensiblen und hypersensiblen Genotypen untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei die postulierte Hemmung der Virusausbreitung im Grenzbereich zwischen gesundem und nekrotischem Gewebe bei hypersensibel reagierenden Genotypen. Aufgrund des Testsystems konnten nur schwach hypersensible Genotypen zu den Untersuchungen herangezogen werden, da stark hypersensible (HK 2 und 3) mit raschen Absterbeerscheinungen auf Inokulation durch Doppelpfropfung reagieren.

Material und Methoden

Pflanzenanzucht. Je drei Pflanzen schwach hypersensibler Genotypen (HK 1) sowie sensible Zuchtklone wurden, wie in Kapitel 2.1 „Variabilität des Merkmals „Hypersensibilität“ in Kreuzungsnachkommenschaften“ auf S. 42 beschrieben, im Jahr 2004 im Gewächshaus der Versuchstation für Gartenbau angezogen (s. Tab. 3.3–1). Sie wurden durch Doppelpfropfung mit virusinfiziertem Zwischenveredlungsreis mit PPV-D infiziert. Als Kontrollen dienten virusfreie Veredlungen der Sorten ‘Katinka’ und ‘Hauszwetsche, Typ Schüfer’, die auf Myrobalanensämlingen als Unterlage unter gleichen Bedingungen wie die Doppelpfropfungen im Foliengewächshaus angezogen wurden.

Probenahme und Anfertigung mikroskopischer Schnitte. Nach Ausprägung deutlich erkennbarer Blattspreitennekrosen bei den hypersensiblen Genotypen wurden den PPV-infizier-

Tab. 3.3-1 Für den PPV-Nachweis verwendete Genotypen und ihre Reaktion auf PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung

Genotyp	Symptome auf der Blattspreite
Hauszweitsche, Typ Schüfer	Chlorosen
Katinka	Chlorosen
Hoh 6588	sehr starke Chlorosen
Hoh 8064	Chlorosen, anthocyanreiche Blattadern im chlorotischen Bereich der Blattspreite
Hoh 6067	schwache Nekrosen
Hoh 6749	Chlorosen und mittlerstarke Bekrosen
Hoh 7558	starke Chlorosen und Nekrosen

ten Pflanzen symptomtragende Blätter und den virusfreien Bäumen Blätter entsprechenden Alters entnommen, fixiert und in Kunstharz eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden Semidünnschnitte (5 µm) angefertigt und auf Objektträger überführt. Anschließend wurden sie dem Immunogold-Silverstaining (s. u.) unterzogen. Danach wurden die Schnitte mit Safraninfärbung mit oxidativer Vorbehandlung (GUTMANN 1995) oder ACN-Lösung gefärbt. Schließlich wurden Dauerpräparate angefertigt. Die genannten Verfahren sind auf S. 45 ff. und S. 70 beschrieben.

Virusnachweis. Für den Nachweis von PPV im Blattgewebe wurde das Verfahren des Immunogold-Silverstainings (IGSS) verwendet. Dabei wurde das Hüllprotein des Scharkavirus durch spezifische Antikörper markiert. In einem zweiten Schritt wurde der Ort der Bindungen der primär applizierten Antikörper sichtbar gemacht:

Die Semidünnschnitte wurden nach der Überführung auf Objektträger getrocknet. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurden die Schnitte für 60 min in jeweils 150 µl Blockierungsreagenz (10 ml/l BSA-c (acetyliertes Rinderserumalbumin der Fa. Aurion, Wageningen, Niederlande), 20 g/l Polyvinylpyrrolidon (M: 10000–15000 g/mol), 15 mM NaN₃ in PBS-Puffer (1×) (Applichem, Darmstadt), pH 7,4) inkubiert. Anschließend wurden sie für 80 min einer Lösung mit primären Antikörpern ausgesetzt: Es wurden monoklonale, nicht stammsspezifische Anti-PPV-

Antikörper der Firma Bioreba (Reinach, Schweiz) verwendet. Die Antikörper der Klasse IgG (Subklasse 2a) waren von der Fa. Bioreba aus Mauszellkulturüberständen (aus *In vitro*-Produktion) gewonnen und mittels Ammoniumsulfat-Ausfällung und Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt worden. Sie lagen in PBS Puffer (pH 7,4) mit 30,8 mM Natriumazid in einer Konzentration von 4 mg/ml vor. Für die Inkubation wurde die Antikörperlösung in Inkubationspuffer auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Dieser bestand aus 2 ml/l BSA-c, 20 g/l Polyvinylpyrrolidon (M: 10000–15000 g/mol) und 15 mM NaN₃ in PBS-Puffer (1×) (Applichem, Darmstadt), pH 7,4. Danach wurden die Objektträger dreimal für je fünf Minuten in Inkubationspuffer (ohne primäre Antikörper) gewaschen. Anschließend wurden auf die Schnitte für 120 min je 150 µl Inkubationspuffer mit 1 % (v/v) sekundärem Antikörper (Ziege-anti-Maus-IgG, markiert mit Goldpartikeln des Durchmessers 0,8 nm, Fa. Aurion) gegeben. Diese sekundären Antikörper banden an die primären Antikörper, die ihrerseits an das PPV-Hüllprotein gebunden waren. Es schlossen sich drei Waschschrte in antikörperfreiem Inkubationspuffer und zwei Waschungen in reinstem Wasser für jeweils 5 min an. Die Verstärkung des Goldsignals durch Ausfällen elementaren Silbers (LACKIE 1996) erfolgte mit Reagentien der Fa. Aurion nach deren Anwendungsvorschriften: Die beiden Komponenten „Developer“ und „Enhancer“ für die Lichtmikroskopie wurden nach Annahme der Zimmertemperatur im Verhältnis 1:1 gemischt. 150 µl wurden pro Präparat aufgetragen und ca. 25 min inkubiert, bis unter dem Invertmikroskop bei schwachem Licht ggf. ein Silberniederschlag erkennbar wurde. Die Redoxreaktion, die zum Ausfällen des Silbers an den Goldkeimen führt, wurde durch dreimaliges Waschen in reinstem Wasser unterbrochen. Sämtliche Inkubationsschritte wurden in einer Feuchteammer bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden nach dem IGSS getrocknet und wie oben beschrieben gefärbt.

Das vorgestellte immunologisch-histochemische Nachweisverfahren für PPV mittels IGSS wurde zunächst an Schnitten durch Blattspreiten PPV-infizierter und virusfreier Kontroll-

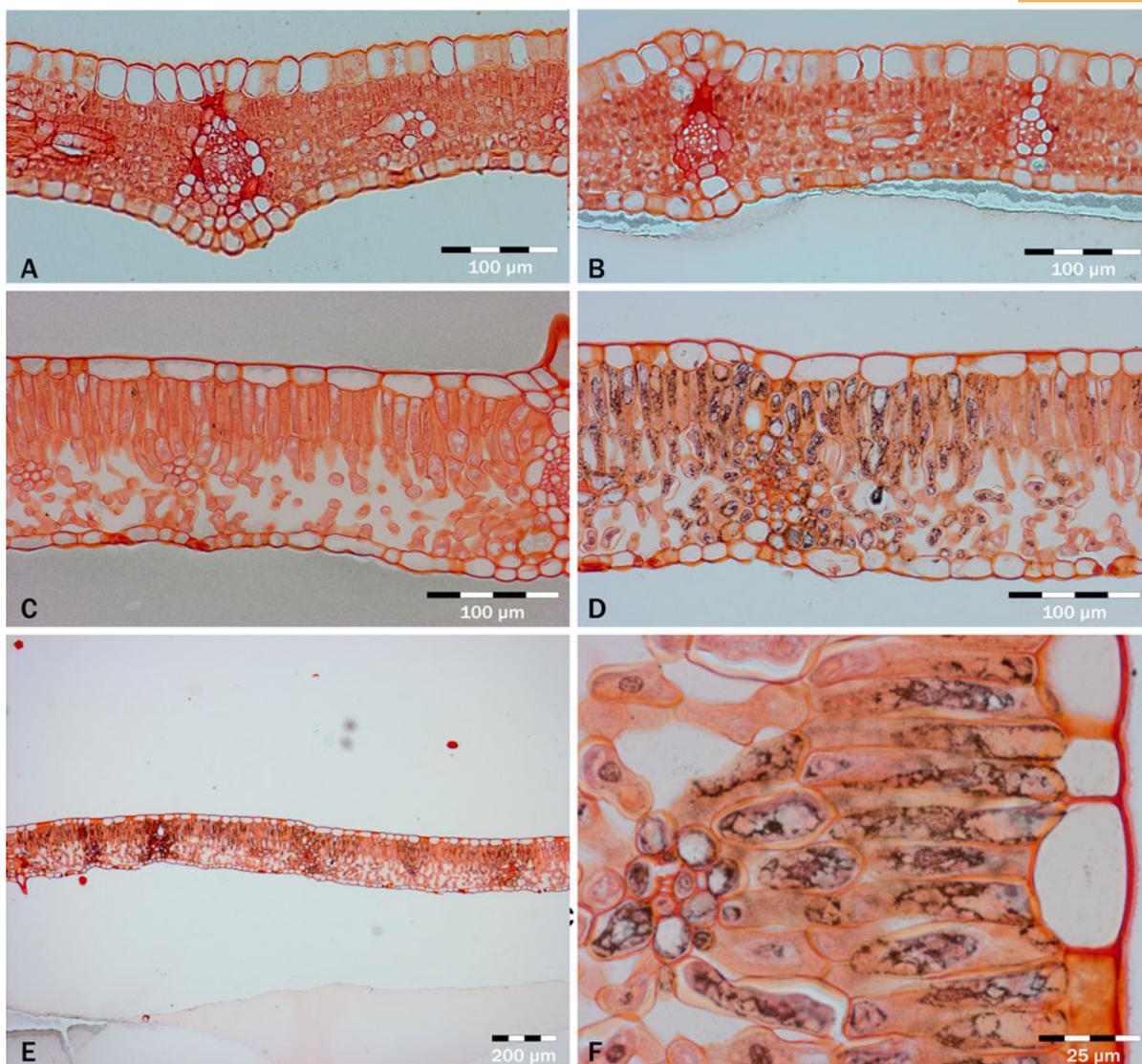


Abb. 3.3-1 Nachweis des PPV-Hüllproteins in der Blattspreite der Sorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' mit IGSS. Safraninfärbung mit oxidativer Vorbehandlung. **A** Kontrolle, ohne primären Antikörper. **B** Kontrolle, mit primärem Antikörper. **C** PPV-infizierte Pflanze, ohne primären Antikörper. **D** PPV-infizierte Pflanze, mit primärem Antikörper. Deutlich erkennbarer, schwarzer Silberniederschlag. **E** PPV-infizierte Pflanze, mit primärem Antikörper. Das Virushüllprotein ist in der Blattspreite ungleichmäßig verteilt. **F** PPV-infizierte Pflanze, mit primärem Antikörper. Die Schwarzfärbung tritt vornehmlich im Cytosol auf, große Teile der Zelle (Vakuole) sind ungefärbt. In den Zellen der Epidermis ist kein Silberniederschlag sichtbar.

pflanzen der Sorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' durch Variation der Inkubationszeiten der primären und sekundären Antikörper, der Konzentration der eingesetzten Antikörperlösungen und der Art der Absättigung unspezifischer Bindungen vor Beginn der Antikörperapplikation etabliert. Durch die Verwendung virusfreien und virusbefallenen Pflanzenmaterials wurde die Spezifität der primären Antikörper sichergestellt.

Bei allen durchgeführten PPV-Nachweisen wurde als Kontrolle bei vier Schnitten pro Va-

riante die beschriebene Prozedur ohne die primären Antikörper durchgeführt. Statt der Anti-PPV-Antikörper-Lösung wurde lediglich die Inkubationslösung verwendet. Auf diese Weise konnte die Spezifität der Bindung der sekundären Antikörper überprüft werden.

Ergebnisse und Diskussion

Etablierung der IGSS-Methode. Abb. 3.3-1 zeigt die Ergebnisse des IGSS bei 'Hauszwetsche,

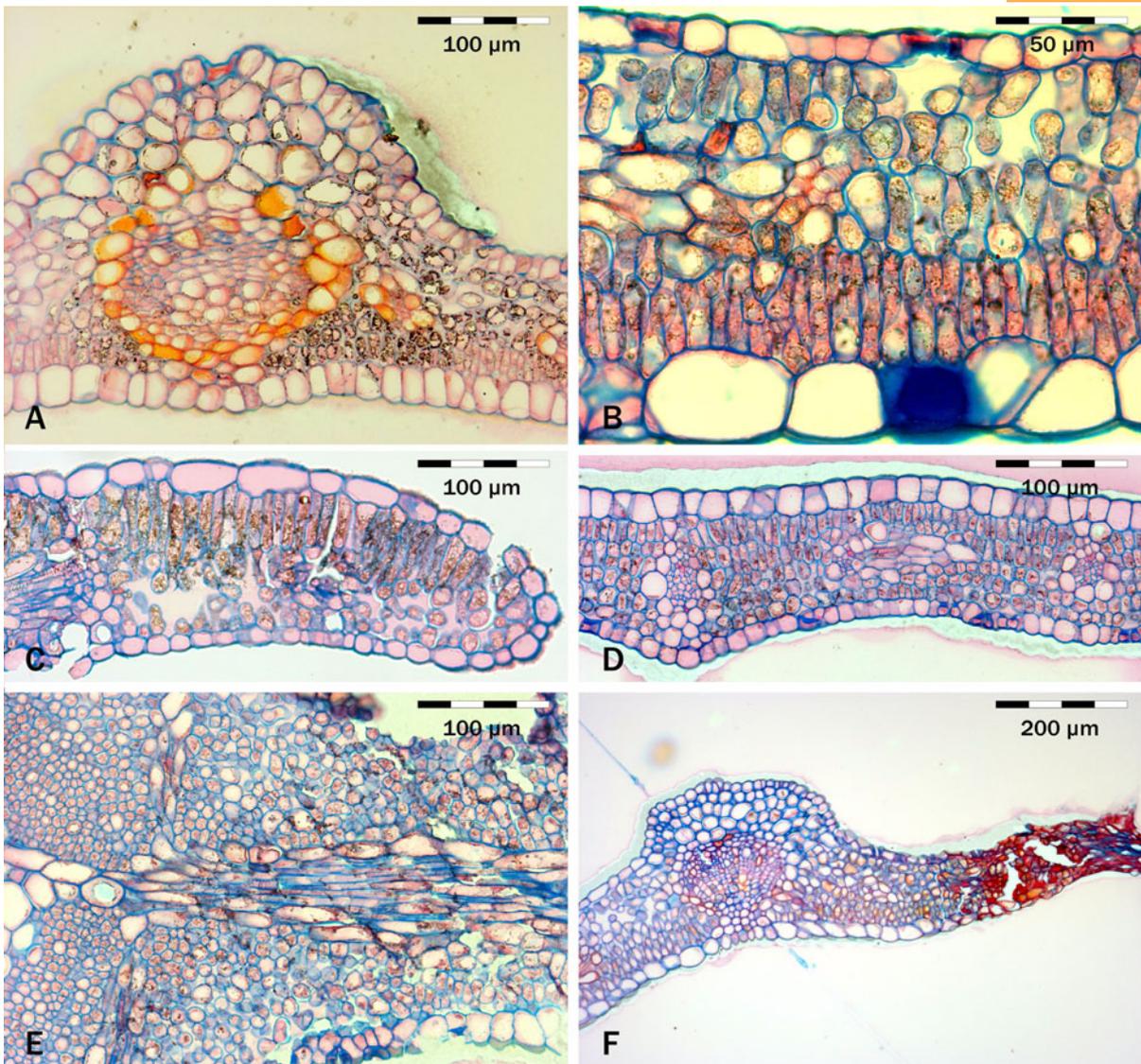


Abb. 3.3-2 Nachweis des PPV-Hüllproteins in der Blattspreite verschiedener Genotypen mit IGSS. ACN-Färbung. Blätter entnommen von PPV-infizierten Pflanzen. **A** 'Katinka' (sensibel). **B** 'Hoh 8064' (sensibel). **C** 'Hoh 6588' (sensibel). **D** 'Hoh 6067' (sehr schwache Blattspreitennekrosen). **E** 'Hoh 6067'. Längsschnitt durch die Blattspreite. **F** 'Hoh 6749' (starke Blattspreitennekrosen).

Typ Schüfer'. In der Blattspreite der virusfreien Kontrollpflanzen trat kein Silberniederschlag auf. In Schnitten durch die Blattspreite PPV-infizierter Pflanzen war in der Variante mit Behandlung in Inkubationslösung, die frei von primären Antikörpern war, ebenfalls kein Niederschlag erkennbar, wohl aber in der Variante, die primären Antikörpern ausgesetzt war. Damit wurde gezeigt, dass das beschriebene IGSS-Verfahren spezifisch die Anwesenheit von PPV-Hüllprotein anzeigt. Sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper banden spezifisch.

Die Verteilung des PPV-Hüllproteins in der Blattspreite der sensiblen Sorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' war unregelmäßig. Insbesondere in der Nähe von Leitgefäßen bildete sich ein deutlich stärkerer Silberniederschlag als in anderen Gewebebereichen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der bei vielen Viren, die Mosaiksymptome hervorrufen, beobachteten ungleichmäßigen Verteilung der Viren in der Blattspreite (Phänomen der „grünen Inseln“, FRASER 1985b). Selbst in den Gewebebereichen, in denen starke Silberniederschläge auf eine hohe Viruskonzentration schließen ließen, gab es Zellen, in

denen kein Virus nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.3–1 F). Dies kann auf in einzelnen Zellen induzierte Resistenz zurückzuführen sein, wie sie etwa durch gene silencing (WATERHOUSE et al. 1999, s. Kapitel 1.4.3.1 „Posttranscriptional gene silencing“ auf S. 23) vermittelt wird.

Verbreitung des Virus in der Blattspreite bei sensiblen und hypersensiblen Genotypen. Bei allen untersuchten Genotypen, die sensibel gegenüber PPV reagieren und keine Blattspreitennekrosen ausbilden, wurde Silberniederschlag in der gesamten Blattspreite nachgewiesen (s. Abb. 3.3–2 A, B, C). Die geringste Dichte des Silberniederschlags wurde in den Epidermiszellen beobachtet. In an Leitgefäße grenzenden Geweben konnte in den meisten Fällen PPV nachgewiesen werden (s. Abb. 3.3–2 A).

Bei den untersuchten Genotypen, die (schwach) hypersensibel reagieren, zeigte sich ein differenziertes Bild: Bei einigen Zuchtklonen (z. B. ‘Hoh 6067’, welcher zwar Rinden-, aber nur sehr schwache Blattspreitennekrosen ausbildet), war in der Verteilung des PPV-Hüllproteins in der Blattspreite kein Unterschied zu den sensiblen Genotypen festzustellen (s. Abb. 3.3–2 D, E im Vergleich zu A, B, C). Bei anderen wiederum (z. B. ‘Hoh 6749’, s. Abb. 3.3–2 F), die mit starken Blattspreitennekrosen auf PPV-Befall reagierten, war PPV in der Blattspreite nicht nachweisbar: Weder im gesunden noch im Grenzbereich zwischen nekrotischem und gesundem Gewebe bildete sich ein Silberniederschlag. Diese Genotypen waren demnach in der Lage, die Ausbreitung des Virus in der Blattspreite durch die HR zu verhindern.

Diese Befunde stimmen mit dem Ergebnis des ROS-Nachweises in der Blattspreite von Genotypen, die eine vergleichbare Abwehrreaktion gegenüber PPV zeigen, überein (s. Kapitel 3.2.2 „Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid in der Blattspreite hypersensibler Genotypen“ auf S. 72). Allerdings ist der Ablauf des programmierten Zelltods nicht bei allen Genotypen ausreichend, um die Ausbreitung des Virus in der Blattspreite zu verhindern. Über ähnliche Beobachtungen berichten KEGLER et al. (2002). Die Virusausbreitung im Blattgewebe wird also nur bei

Genotypen begrenzt, die einen ausreichend hohen Hypersensibilitätsgrad aufweisen. Sie sind zu einer Lokalisierung des Scharkavirus befähigt.

Obstbaulich wertvoll sind diejenigen Genotypen, die bei natürlicher PPV-Infektion über Blattläuse als Vektoren das Virus im Blattgewebe rasch lokalisieren. Sie bleiben im Feld symptom- und befallsfrei. Nekrosen und Absterberescheinungen zeigen sie ausschließlich nach künstlicher Inokulation mittels Pfropfung.

Mit der vorgestellten Methode zum Nachweis des Scharkavirus in der Blattspreite der Europäischen Pflaume steht ein Verfahren zur Verfügung, das mit deutlich höherer Auflösung als das Tissue-print-immunoblotting (HOFFMANN et al. 1997) die Beobachtung der Virusausbreitung in der Pflanze zulässt. Hierin ist es vergleichbar mit dem Nachweis viraler Nucleinsäure durch *In-situ*-Hybridisierung: ION-NAGY et al. (2004a) wiesen damit PPV in Geweben der Aprikose nach und nutzten das Verfahren zur Untersuchung verschiedener Resistenzmechanismen bei dieser Obstart. In verschiedenen Tabakarten wiesen RIEDEL et al. (1998) das PPV-Hüllprotein mittels IGSS nach. Das hier vorgestellte Verfahren zum Nachweis von PPV in Geweben der Europäischen Pflaume nutzt erstmals sekundäre Antikörper, die mit ultrakleinen Goldpartikeln mit einem Durchmesser von 0,8nm markiert sind. Dies erleichtert die Penetration der Antikörper durch die Zellstrukturen und durch das Einbettungsmedium erheblich und bringt daher eine höhere Nachweisempfindlichkeit mit sich (LACKIE 1996). Bislang wurden nur Goldpartikel mit einem Durchmesser von mehr als 10nm als Markierung der sekundären Antikörper verwendet.

3.3.2 Virusnachweis mittels eines rekombinanten, GFP-exprimierenden PPV-Isolats

Zielsetzung. Sensible und hypersensible Genotypen der Europäischen Pflaume sollten mit einem PPV-Isolat infiziert werden, das ein *green fluorescent protein* (GFP) exprimiert. Ein derartiges rekombinantes Isolat wurde von der Arbeitsgruppe um J. A. GARCÍA an der Universität Madrid her-

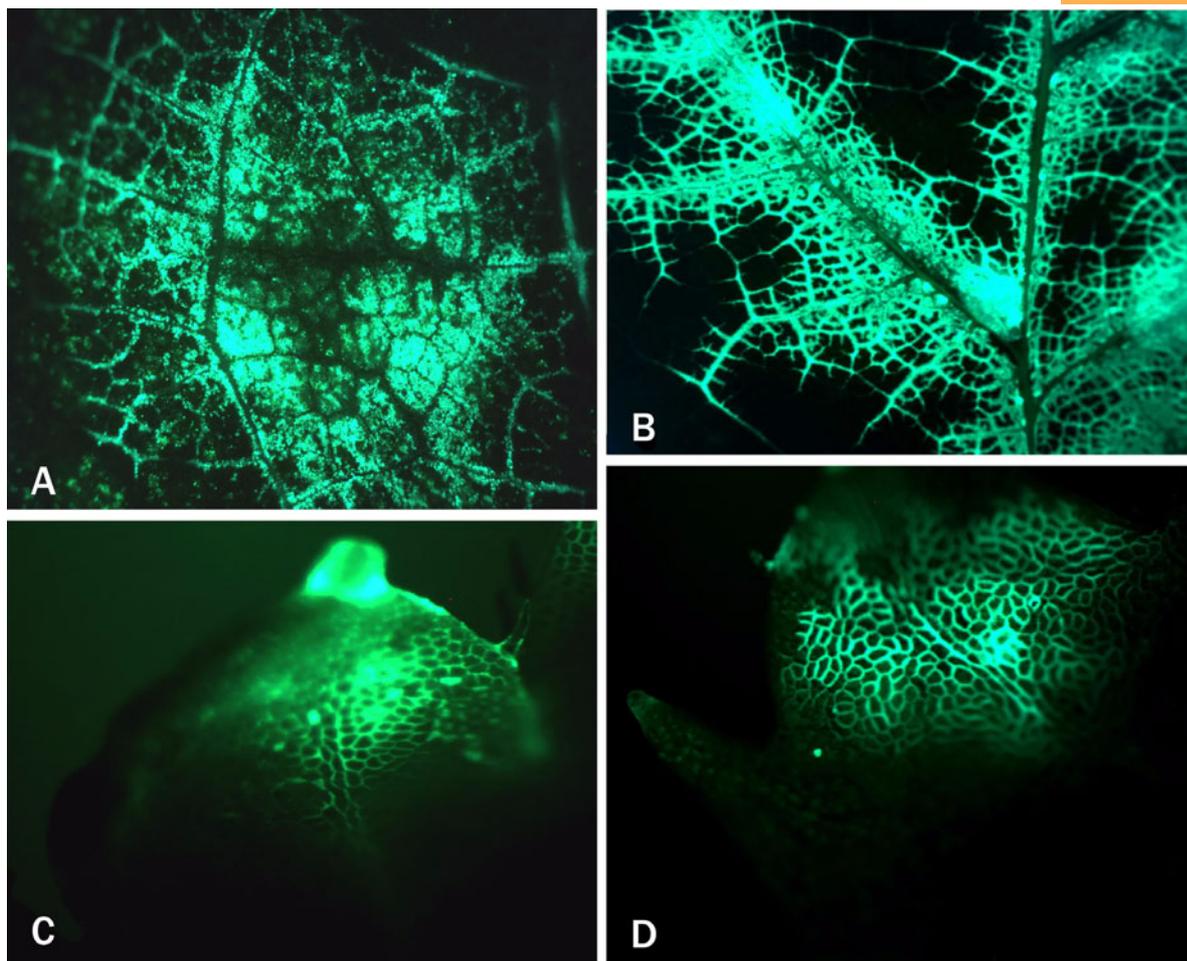


Abb. 3.3–3 Nachweis von PPV-GFP (grüne Fluoreszenz) in der Blattspreite verschiedener Genotypen im Stereomikroskop unter Fluoreszenzlicht. **A** 'Hoh 7401' (sensibel). Blattadern und angrenzende Gewebe fluoreszieren. **B** 'Jaspy' (sensibel). (Wie A). **C, D** 'Hoh 7344' (hypersensibel). Die Fluoreszenz tritt nicht in Blattadern und nur in einem begrenzten Bereich der Blattspreite auf.

gestellt, indem das GFP-codierende Gen aus *Aequorea victoria* in das Genom eines PPV-D-Isolats integriert wurde (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al. 2001). Ein System zur Beobachtung der Ausbreitung von Viren, das auf der Expression des genannten Gens beruht, wurde erstmals von BAULCOMBE et al. (1995) beschrieben. Das PPV-GFP-Isolat wurde freundlicherweise von J. A. GARCÍA zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden

Die aus der Kreuzungskombination 'Jojo' × 'Fellenberg' an der Universität Hohenheim hervorgegangenen PPV-sensiblen (HK 0) Zuchtnummern 'Hoh 7344' und 'Hoh 7381' und stark hypersensiblen (HK 3) Genotypen 'Hoh 7344' und 'Hoh 7378' sowie der PPV-sensible (HK 0) Klon

'Jaspy' (*(Prunus salicina* × *P. cerasifera*) × *P. spinosa*) wurden in drei Wiederholungen im März 2004 in einem Glasgewächshaus des Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Bordeaux Aquitaine (Frankreich) auf die Unterlage 'GF 305' (*Prunus persica*) durch *chip budding* veredelt. Anfang Mai wurden je zwei Pflanzen pro Genotyp durch Veredlung von Rindenspänen in die Unterlage mit dem rekombinanten Isolat PPV-GFP inokuliert. 30 Tage nach der Inokulation wurden den Austrieben der aufveredelten Sorten Blätter entnommen und mittels ELISA-Test (s. S. 43) auf Anwesenheit des Virus überprüft. Von jeder Pflanze wurden Blätter im Stereomikroskop (Leica MZFLIII, Anregungswellenlänge 450–490 nm, Sperrfilter 500–550 nm) und im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica TSC SP2, Anregungswellenlänge 488 nm,

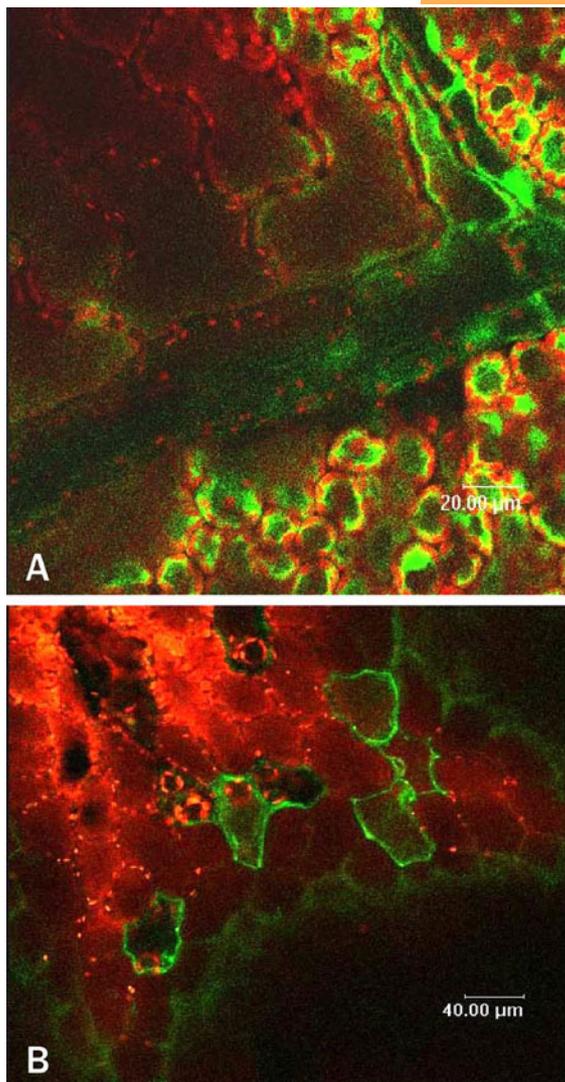


Abb. 3.3–4 Nachweis der Verbreitung von PPV-GFP in der Blattspreite von Genotypen der Europäischen Pflaume. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Grüne Fluoreszenz: PPV-GFP. Rote Fluoreszenz: Chlorophyll. (Überlagerung der auf zwei Kanälen aufgenommenen Bilder.) **A** 'Jaspy' (sensibel). PPV-GFP ist in den meisten Zellen der Blattspreite vorhanden. **B** 'Hoh 7344' (stark hypersensibel). Die grüne Fluoreszenz, die PPV-GFP nachweist, ist auf wenige, einzelne Zellen beschränkt.

Emissionswellenlänge 505–525 nm (Kanal 1, Fluoreszenz des GFP) bzw. 685–740 nm (Kanal 2, Autofluoreszenz des Chlorophylls)) nach der von LANSAC et al. (2004) und ION-NAGY et al. (2004b) beschriebenen Methode untersucht.

Ergebnisse

Die phänotypische Ausprägung der PPV-Symptome der mit PPV-GFP inokulierten Pflanzen entsprach den in Kapitel 2 „Ausprägungsformen der Hypersensibilität gegenüber PPV“ auf S. 41 gemachten Angaben: Die Austriebe der hypersensiblen Genotypen starben etwa 90 Tage nach der Inokulation mit PPV-GFP ab. Die sensiblen Genotypen entwickelten typische Scharkasymptome auf der Blattspreite und waren im ELISA-Test PPV-positiv.

In den virusfreien Kontrollen konnte im Stereomikroskop keine Grünfluoreszenz beobachtet werden. Bei den sensiblen Genotypen fluoreszierten weite Teile der Blattspreite grün, was als Nachweis des GFP gilt und die Verbreitung des PPV-GFP widerspiegelt. Besonders die Blattadern und die umliegenden Zellschichten zeigten eine deutliche Fluoreszenz (s. Abb. 3.3–3 A und B).

Bei den hypersensiblen Genotypen beschränkte sich die Fluoreszenz auf eng begrenzte Bereiche der Blattspreite. In den Blattadern konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden (s. Abb. 3.3–3 C und D). Sie trat nicht in der Vakuole, sondern nur im Cytoplasmasaum entlang der Zellwand auf.

Auch bei der Untersuchung im konfokalen Laser Scanning Mikroskop zeigte sich, dass bei hypersensiblen Genotypen die Fluoreszenz auf einzelne Zellen beschränkt ist, während bei sensiblen Genotypen weite Teile des Blattparenchyms fluoreszieren (s. Abb. 3.3–4).

Diskussion

In den vorausgegangenen Abschnitten konnte die Verbreitung des Scharkavirus nur in sensibel und schwach hypersensibel reagierenden Genotypen untersucht werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse ermöglichen einen Blick auf stark hypersensible Zuchtklone. Hier zeigt sich, dass die Ausbreitung des Virus auf eng begrenzte Gewebereiche der Blattspreite beschränkt ist. Im Gegensatz zu sensiblen und schwach hypersensiblen Genotypen sind stark hypersensible durchwegs in der Lage, das Virus vollständig auf einzelne Gewebereiche zu lokalisieren. Diese Ergebnisse

stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass stark hypersensibel reagierende Genotypen im Feld befallsfrei bleiben. Dies kann damit erklärt werden, dass sie auf natürliche Infektionen mit Blattläusen mit dem Einleiten einer HR antworten und die PPV-Infektion so auf wenige Zellen beschränken können. Dies entspricht einer Resistenz durch Hypersensibilität mit Lokalisierung des auslösenden Schaderregers, wie sie KEGLER et al. (2001) für Nachkommen des Klons 'K4' beschreiben.

Fluoreszenz trat nicht im Bereich der Vakuole auf. Dieses Ergebnis bestätigt den beim Virusnachweis mittels IGSS erhaltenen Befund, dass PPV nur im Cytoplasma vorkommt (s. vorangehendes Kapitel).

3.3.3 Zusammenfassung

In sensiblen und schwach hypersensiblen Genotypen kann sich das Scharkavirus nach Inokulation durch Doppelpfropfung oder *chip budding* systemisch in der Blattspreite ausbreiten.

Stärker hypersensibel reagierende Genotypen sind nach künstlicher Inokulation in der Lage, die Ausbreitung des Scharkavirus auf begrenzte Bereiche der Blattspreite zu beschränken.

Aus dieser Fähigkeit kann die Feldresistenz stark hypersensibel reagierender Genotypen abgeleitet werden.

4 Vererbung der Hypersensibilität gegenüber PPV

Für die Nutzung der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume in der Züchtung ist eine möglichst genaue Kenntnis ihrer genetischen Grundlagen erforderlich. Zum einen interessiert, ob das Merkmal stabil an Nachkommen weitergegeben werden kann, zum anderen, ob es Unterschiede in der Kombinationseignung verschiedener Zuchteltern hinsichtlich des Anteils hypersensibler reagierender Genotypen in ihren Nachkommenschaften gibt. Diesen beiden Fragestellungen sollte nachgegangen werden, indem im Hohenheimer Züchtungsprogramm vorhandene Nachkommenschaften, die aus wenigstens einem hypersensiblen Elternteil hervorgingen, auf dieses Merkmal untersucht wurden.

Vorangestellt sei eine Bemerkung zum Gebrauch der Begriffe „Kreuzungsnachkommenschaften“ und „Kreuzungspopulationen“: Als „Population“ wird in der Ökologie die Gesamtheit aller Individuen einer Art bezeichnet, die sich untereinander fortpflanzen (STRASBURGER 1991). Sie müssen also zur gleichen Zeit im gleichen Gebiet nebeneinander existieren. In einer Population ist Genfluss möglich. Sobald z. B. geographische Barrieren diesen verhindern, liegen zwei verschiedene Populationen vor, die aber im-

mer noch zu einer Art gehören. Diese Definition von Population ist nicht voll mit dem Gebrauch des Begriffes in der Züchtung gleichzusetzen. Jedoch hat er in seiner eigentlichen Bedeutung auch in der Züchtung eine Aussagekraft: Der Züchter schafft mit der Auswahl der Elterngeneration eine Population, indem er den Genfluss zwischen den als Eltern auserkorenen und den übrigen Individuen derselben Art künstlich unterbindet, z. B. durch räumliche Trennung der Pflanzen oder durch Verhüllen von Blüten zur Verhinderung unkontrollierter Befruchtung bei Spermatophyten. Aus der daraus hervorgehenden Generation, die oft ungenau als Population oder Kreuzungspopulation bezeichnet wird, wählt der Züchter im Selektionsprozess geeignete Individuen aus. Für die Gesamtheit der ausgewählten Elternpflanzen wird hier der Begriff „Zuchtpopulation“ vorgeschlagen; sie wird nämlich durch den Züchter künstlich geschaffen und erfüllt alle Kriterien, die der Begriff „Population“ *per definitionem* impliziert. Die korrekte Bezeichnung für die Gesamtheit der aus einer Kreuzungskombination hervorgegangenen Individuen ist „Kreuzungsnachkommenschaft“ und nicht „Kreuzungspopulation“.

4.1 Material und Methoden

Die Nachkommen der in Tab. 2.1–1 auf S. 42 aufgeführten Kreuzungskombinationen wurden wie dort beschrieben mittels Inokulation durch Doppelpfropfung auf Hypersensibilität getestet. Aus den Boniturdaten (s. Tab. 2.1–2 auf S. 44) wurde für jeden Genotyp der Hypersensibilitätsindex (HI) und die korrespondierende Hypersensibilitätsklasse (HK) (s. S. 53) bestimmt. Statistisch ausgewertet wurden die Daten mit dem Statistikprogramm MINITAB 14.0. Zur Be-

urteilung von Unterschieden in der Verteilung hypersensibler und anfälliger Genotypen zwischen den Nachkommenschaften wurde der Medianvergleich nach MOOD als verteilungsfreier Test herangezogen. Der MOOD-Test ist das nicht-parametrische Pendant zum t-Test bzw. zum TUKEY-Test, die als parametrische Tests bei normalverteilten Testgrößen verbreitet angewendet werden.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Anteile hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften

Zunächst sollen folgende Fragenkomplexe im Mittelpunkt stehen:

- 1 Wie sind die Hypersensibilitätsindices in der Gesamtheit aller untersuchten Nachkommen verteilt?
- 2 Wie groß ist der Anteil der verschiedenen HK in den einzelnen Kreuzungsnachkommenschaften? Hängt die Größe des Anteils hypersensibler Genotypen von der Kreuzungskombination ab?

In Tab. 4.2–1 sind die Anzahl der getesteten Hybriden, die prozentuale Verteilung der Genotypen verschiedener HK und der prozentuale Anteil der Genotypen mit PPV-Symptomen auf der Blattspreite in den einzelnen Nachkommenschaften, geordnet nach zunehmendem Anteil hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften, aufgeführt. Die Durchschnittswerte für die Gesamtheit der untersuchten Hybriden sind angegeben.

In Abb. 4.2–1 ist der Anteil der Genotypen in den Nachkommenschaften verschiedener Kreuzungskombinationen nach den ihnen zugeordneten Hypersensibilitätsklassen dargestellt. Die Genotypen, die den Hypersensibilitätsklassen 2 und 3 zugeordnet werden, können als obstbaulich wertvoll bezüglich der Reaktion gegen-

über PPV bezeichnet werden, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Feldresistenz gegenüber PPV besitzen. Hybriden der HK 1 sind für den Anbau ungeeignet, da sie nicht zur Lokalisierung des Virus befähigt sind und Absterbescheinungen nach PPV-Inokulation zeigen können. In HK 0 fallen alle Genotypen, die nicht hypersensibel reagieren. Über ihre PPV-Fruchttoleranz konnte im Rahmen der Untersuchungen keine Aussage getroffen werden. In den nachfolgenden Ausführungen wird, sofern nicht anders vermerkt, die Summe der Anteile aus HK 2 und HK 3 als „Anteil hypersensibler Genotypen“ in einer Nachkommenschaft bezeichnet.

In Abb. 4.2–2 sind Histogramme des Hypersensibilitätsindex dargestellt. Die Häufigkeitsverteilung der HI in der Gesamtheit der untersuchten Hybriden belegt, dass keine Normalverteilung vorliegt: Ein hoher Anteil an Hybriden war der HK 0 zuzuordnen. Mit mehr als 600 Individuen beinhaltet diese HK mehr als die Hälfte (53,3%) der Nachkommen. In HK 1 fanden sich 6,6%, in HK 2 7,4% und in HK 3 32,7% der Hybriden (s. auch Tab. 4.2–1). Betrachtet man die Gesamtheit der untersuchten Nachkommen, so kann festgestellt werden, dass die beiden Extremenklassen HK 0 und HK 3 mit jeweils einem relativ hohen Anteil vertreten waren.

Zwischen den einzelnen Kreuzungskombinationen gab es aber deutliche Unterschiede in der Verteilung der HI unter den Nachkommen.

Tab. 4.2-1 Anzahl der getesteten Hybriden, prozentuale Verteilung der Genotypen verschiedener Hypersensibilitätsklassen (HK) und prozentualer Anteil der Genotypen mit PPV-Symptomen auf der Blattspreite in den einzelnen Nachkommenschaften, geordnet nach zunehmendem Anteil hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften. Hypersensible Eltern sind durch Farbdruck gekennzeichnet.

Nr. Kreuzungs-kombination	Anzahl ^a	HK 0 (%)	HK 1 (%)	HK 2 (%)	HK 3 (%)	HK 2+3 (%) ^b	PPV (%) ^c	PPV - HK 0 (%) ^d	Ø HI ^e	Median (HI) ^f
5 Cacaks Schöne × (Ort × Stan 34)	9	88,9	11,1	0,0	0,0	0,0	100,0	11,1	0,04	0,02
21 Jojo × Klön 128	43	72,1	16,3	7,0	4,6	11,6	95,4	23,3	0,12	0,00
20 Jojo × Klön 108	68	70,6	11,8	5,9	11,8	17,7	79,4	8,8	0,16	0,03
12 Jojo × C. Fruchtbare	62	77,4	3,2	4,8	14,5	19,4	77,4	0,0	0,18	0,00
24 Jojo × Zwintschers Frühe	47	69,0	12,8	0,0	21,3	21,3	76,6	10,6	0,22	0,03
3 Cacaks Beste × (Ort × Stan 34)	14	71,4	7,1	0,0	21,4	21,4	85,7	14,3	0,20	0,00
4 Cacaks Fruchtbare × (Ort × Stan 34)	30	66,7	10,0	0,0	23,3	23,3	86,7	20,0	0,21	0,02
10 Jojo × Hoh 1468	70	65,7	10,0	10,0	14,3	24,3	71,4	5,7	0,21	0,03
19 Jojo × Katinka	51	52,9	21,6	9,8	15,7	25,5	70,6	17,7	0,24	0,07
17 Jojo × Hauszwetsche, Typ Schüfer	31	64,5	9,7	3,2	22,6	25,8	64,5	0,0	0,25	0,04
23 Jojo × Presenta	77	61,0	11,7	13,0	14,3	27,3	74,0	13,0	0,21	0,04
6 Elena × (Ort × Stan 34)	63	58,7	1,6	9,5	30,2	39,7	63,5	4,8	0,33	0,03
16 Jojo × Hauszwetsche, Typ Gunser	20	40,0	20,0	0,0	40,0	40,0	60,0	20,0	0,39	0,12
9 Jojo × Haganta	7	57,1	0,0	14,3	28,6	42,9	57,1	0,0	0,35	0,07
2 Hoh 4515 × Jojo	63	50,8	4,8	7,9	36,5	44,4	57,1	6,4	0,39	0,09
7 Fellenberg × Jojo	20	55,0	0,0	0,0	45,0	45,0	50,0	-5,0	0,43	0,05
13 Jojo × Fellenberg	76	52,6	0,0	2,6	44,7	47,4	56,6	7,0	0,42	0,07
25 (Ort × Stan 34) × Hanita	43	46,5	4,7	7,0	41,9	48,8	51,2	4,7	0,42	0,37
8 Hanita × Jojo	52	44,2	3,9	11,5	40,4	51,9	53,9	9,6	0,43	0,46
14 Jojo × Felsina	91	41,8	4,4	7,7	46,2	53,9	51,7	9,9	0,50	0,57
22 Jojo × (Ort × Gerst 17)	14	42,9	0,0	0,0	57,1	57,1	50,0	7,1	0,51	0,76
18 Jojo × Jojo	33	42,4	0,0	3,0	54,6	57,6	42,4	0,0	0,47	0,72
15 Jojo × Hanita	49	40,8	0,0	18,4	40,8	59,2	51,0	10,2	0,47	0,56
26 (Ort × Stan 34) × Jojo	47	34,0	2,1	14,9	48,9	63,8	36,2	2,1	0,54	0,69
11 Jojo × Hoh 4465	14	21,4	0,0	14,3	64,3	78,6	21,4	0,0	0,69	0,87
1 Hoh 4465 × Jojo	58	10,3	1,7	5,2	82,8	87,9	10,3	0,0	0,81	0,93
Gesamt	1152	53,3	6,6	7,4	32,7	40,1	61,0	7,7	0,35	0,07

a Anzahl der geprüften Genotypen pro Nachkommenschaft

b prozentualer Anteil der Genotypen der HK 2 und 3 in den Nachkommenschaften

c prozentualer Anteil der Genotypen mit Scharkasymptomen auf der Blattspreite

d Differenz zwischen dem prozentualen Anteil der Genotypen mit Scharkasymptomen und dem prozentualen Anteil der Genotypen der HK 0

e arithmetisches Mittel des Hypersensibilitätsindex

f Median des Hypersensibilitätsindex

Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV

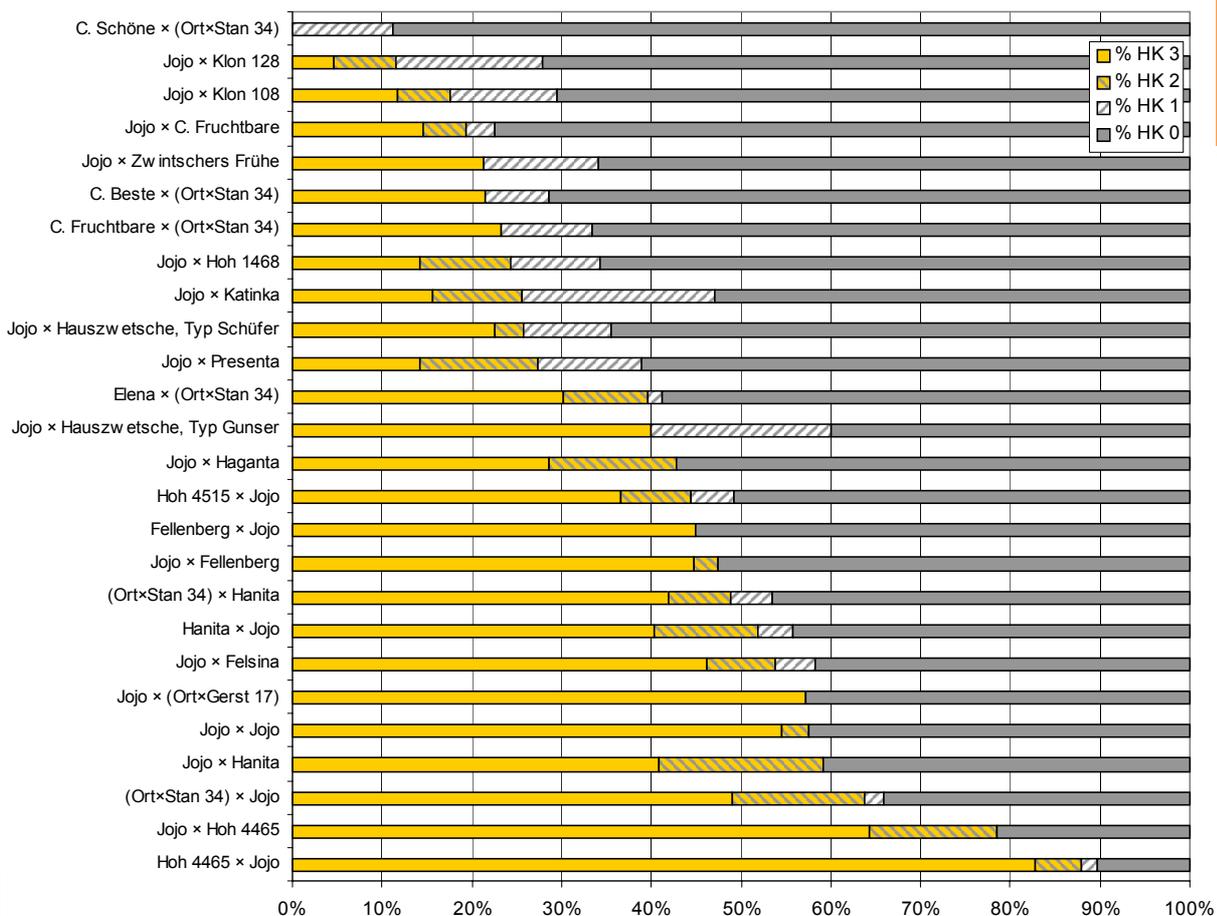


Abb. 4.2-1 Anteil der Genotypen in den Nachkommenschaften verschiedener Kreuzungskombinationen nach Hypersensibilitätsklassen. (Abk.: C. = Cacaks)

Exemplarisch sind in Abb. 4.2-2 die Histogramme für die HI der Nachkommenschaften aus 'Jojo' × 'Hoh 4465' und 'Jojo' × 'Klon 108' dargestellt. Im erstgenannten Fall ließen sich 10,3%, im letzteren Fall 70,6% der Hybriden der Hypersensibilitätsklasse 0 zuordnen, während 82,8% bzw. 11,8% in die HK 3 fielen. Die Summe der Klassen HK 2 und 3 lag bei der Kreuzungsnachkommenschaft mit 'Hoh 4465' als Vatersorte mit 87,9% der Nachkommen um das fünffache höher als bei der Nachkommenschaft mit 'Klon 108' als Pollenspender, bei der 17,7% in die genannten HK fielen.

Die Hypothese, dass keine Unterschiede in der Lage des Medians des HI zwischen den untersuchten Kreuzungskombinationen vorliegen, kann mit dem Mediantest nach MOOD bei einem p-Wert von 0,000 abgelehnt werden. Somit ist belegt, dass die Höhe des Anteils hypersensibler Nachkommen bei Kreuzungskombinationen mit

mindestens einem hypersensiblen Elternteil von den gewählten Kreuzungspartnern abhängig ist.

In Abb. 4.2-3 ist die Differenz zwischen dem prozentualen Anteil der HK > 0 und dem prozentualen Anteil der HK 0 für jede der untersuchten Kreuzungskombinationen dargestellt. Je höher der Anteil hypersensibler Hybriden in einer Kreuzungskombination ist, desto größer ist die Differenz. Die Differenzen schwanken zwischen einem Wert von -77,8 und +79,3 Prozentpunkten. Dies veranschaulicht die statistisch nachgewiesene Abhängigkeit des Anteils hypersensibler Genotypen von der Kreuzungskombination.

Der Anteil an Hybriden, die Scharksymptome auf der Blattspreite zeigen und nicht der HK 0 zuzuordnen sind, ist mit durchschnittlich 7,7% niedrig (s. Tab. 4.2-1). Der Prozentsatz von Hybriden mit PPV-Symptomen ist umso hö-

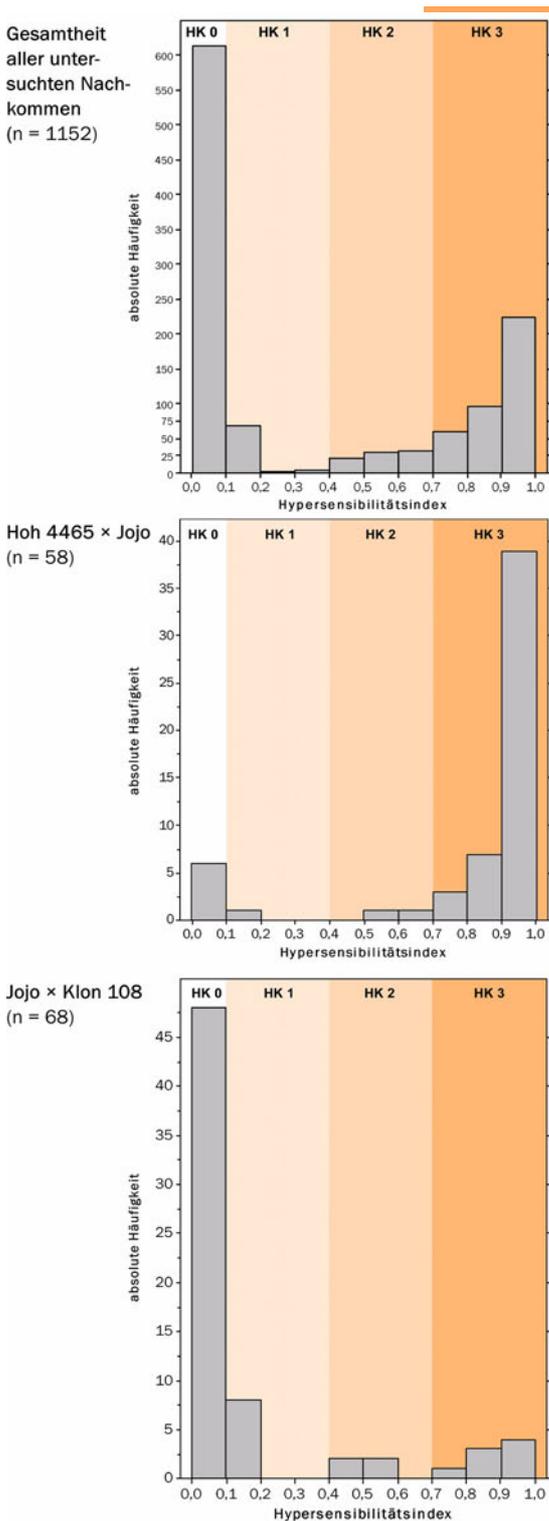


Abb. 4.2-2 Hypersensibilitätsindex. Häufigkeit in der Gesamtheit der untersuchten Hybriden und in zwei exemplarisch ausgewählten Kreuzungsnachkommenschaften. Die Zuordnung zu den HK ist durch Farbunterlegung betont.

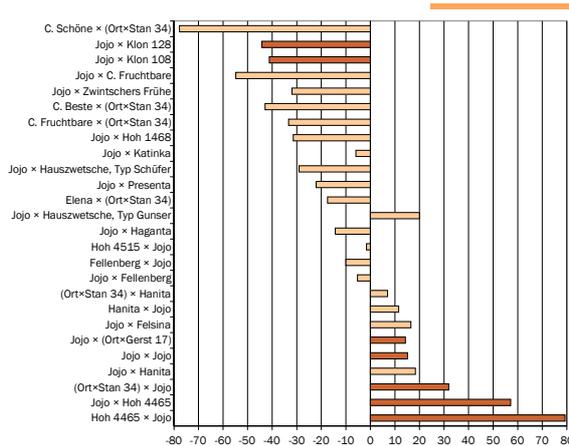


Abb. 4.2-3 Differenz der Summe der prozentualen Anteile der HK 1, 2 und 3 mit dem prozentualen Anteil der HK 0, angegeben in Prozentpunkten. Die Differenzen von Kreuzungskombinationen mit zwei hypersensiblen Elternteilen sind mit dunklerem Farbton hervorgehoben.

her, je niedriger der Anteil hypersensibler Genotypen ist. Nur Hybriden der HK 1 zeigten mitunter PPV-Symptome, bei HK 2 und 3 traten sie nicht auf. Dies ist ein Indiz dafür, dass durch Hypersensibilität eine Scharkaresistenz vermittelt werden kann. Dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnissen von KEGLER et al. (1991).

Die Ergebnisse, die in diesem Abschnitt dargestellt wurden, sind Grundlage für die Ausführungen über die Vererbung der Hypersensibilität in den kommenden Kapiteln. Auf sie wird dort Bezug genommen.

4.2.2 Aussagen über die genetische Determinierung der Hypersensibilität gegenüber PPV

Im voranstehenden Unterkapitel wurde die Gesamtheit der untersuchten Kreuzungsnachkommenschaften betrachtet. Daraus wurden Aussagen über die Häufigkeitsverteilung der HK in den einzelnen Kreuzungsnachkommenschaften im Vergleich zur Verteilung in der Gesamtheit der untersuchten Nachkommen getroffen. Es konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede im Anteil hypersensibler Genotypen zwischen den Kreuzungskombinationen gibt.

Nachfolgend werden die Kreuzungskombinationen untereinander verglichen und daraus

Aussagen zur genetischen Determinierung der Hypersensibilität gegenüber PPV abgeleitet. Geprüft werden die Reziprozität der Vererbung des Merkmals, die Eignung verschiedener Genotypen als Resistenzdonoren und die Kombinations-eignung von Genotypen im Hinblick auf den Anteil hypersensibler Genotypen in den Nachkommen. Die Aussagen basieren auf den im voranstehenden Abschnitt aufgeführten Ergebnissen (Tab. 4.2-1 auf S. 91 und Abb. 4.2-1 auf S. 92). Um dem Leser die Erfassung der für den jeweils betrachteten Aspekt relevanten Daten zu erleichtern, werden in den drei Unterkapiteln die bereits vorgestellten Ergebnisse ggf. erneut und in Auszügen graphisch dargestellt.

Grundlage für die nachfolgende Betrachtung ist der paarweise Vergleich der Verteilung der HI in den Nachkommenschaften. Hierzu wurde wiederum der Mediantest nach MOOD verwendet. In Tab. 4.2-2 sind die Ergebnisse dargestellt. Auf sie wird in den nachfolgenden Abschnitten Bezug genommen.

4.2.2.1 Reziprozität

Ziel. Für die züchterische Nutzung eines Merkmalskomplexes ist es wichtig zu wissen, ob dieser im Kerngenom, im Plasmon oder in beiden Erbinformationsträgern der pflanzlichen Zelle codiert ist. Aussagen darüber ermöglicht ein Vergleich reziproker Kreuzungen mit jeweils einem hypersensiblen und einem sensiblen Elternteil.

Betrachtete Kreuzungskombinationen. Es wurden Nachkommen aus vier Kreuzungskombinationen mit 'Jojo' als einem und 'Fellenberg' und 'Hanita' als anderem Elternteil untersucht, wobei 'Jojo' sowohl als Vater- als auch als Muttersorte Verwendung fand.

Ergebnisse und abgeleitete Aussagen. Bei der Kreuzungskombination 'Hanita'×'Jojo' lag der Anteil hypersensibler Nachkommen (HK 2 und 3) bei 51,9% und bei der reziproken Kreuzungskombination bei 59,2%; bei ersterer wurden 52, bei letzterer 49 Hybriden untersucht (s. Tab. 4.2-1 und Abb. 4.2-1). Von 20 Nachkommen der

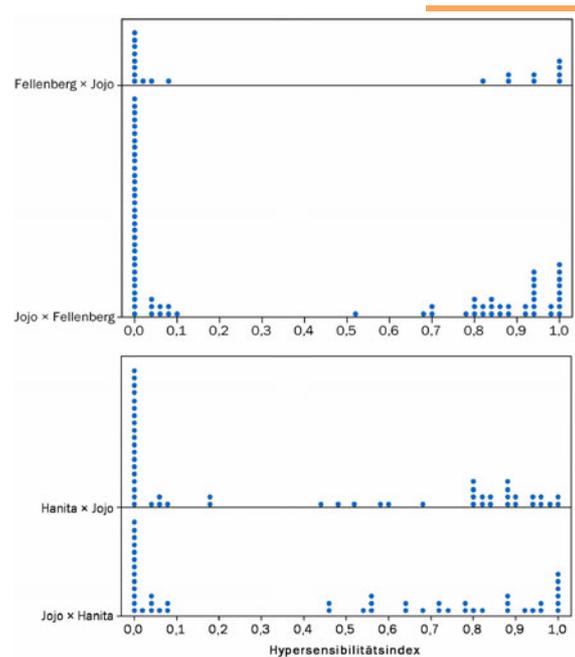


Abb. 4.2-4 Dotplot des HI der Kreuzungskombinationen 'Fellenberg'×'Jojo' und 'Hanita'×'Jojo' und ihrer reziproken Kreuzungen. Jeder Punkt repräsentiert den HI eines getesteten Genotyps.

Kreuzung 'Fellenberg'×'Jojo' reagierten 45% hypersensibel, von 76 Nachkommen der reziproken Kreuzung 47,5%. Statistisch ließ sich bei keiner der reziproken Kreuzungen ein Unterschied in der Lage des Medians des HI nachweisen (s. Tab. 4.2-2). Auch die Häufigkeitsverteilungen des HI der reziproken Kreuzungskombinationen waren sehr ähnlich, wie aus Abb. 4.2-4 ersichtlich ist.

Ob der hypersensible Genotyp als Mutter- oder Vatersorte verwendet wird, hat demnach keinen Einfluss auf den Anteil hypersensibler Genotypen in der Nachkommenschaft. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der Merkmalskomplex Hypersensibilität gegenüber PPV ausschließlich im Plasmon genetisch verankert ist. Eine rein kerngenomische Codierung kann angenommen werden.

LAHMATOVA et al. (1998) beobachteten in Feldtests mit natürlicher PPV-Infektion, dass die Muttersorte einen größeren Einfluss auf die Vererbung der quantitativen Scharkaresistenz hat als die Vatersorte. Für die Vererbung der Resistenz durch Hypersensibilität kann dies mit den vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Tab. 4.2-2 Paarweiser Vergleich der Hypersensibilitätsindizes verschiedener Kreuzungskombinationen, basierend auf der Nullhypothese „Der Median der HI unterscheidet sich nicht.“ (Mediantest nach Mood). */**/***/****: Die Nullhypothese kann auf dem 10%/5%/1%/0,1%-Niveau abgelehnt werden (p-Werte < 0,1 bzw. 0,05 bzw. 0,01 bzw. 0,001); n.s.: nicht signifikant, d. h. die Nullhypothese kann nicht abgelehnt werden.

Anz. ^a Kreuzungskombination	Nr. 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
58 Hoh 4465 x Jojo	1																								
63 Hoh 4515 x Jojo	2	****																							
14 C. Beste x (Ort x Stan 34)	3	****	n.s.																						
30 C. Fruchtbar x (Ort x Stan 34)	4	****	n.s.	n.s.																					
9 C. Schöne x (Ort x Stan 34)	5	**	n.s.	n.s.	n.s.																				
63 Elena x (Ort x Stan 34)	6	****	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.																			
20 Fellenberg x Jojo	7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.																		
52 Hanita x Jojo	8	****	n.s.	*	*	**	n.s.	n.s.																	
7 Jojo x Haganta	9	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.																
70 Jojo x Hoh 1468	10	****	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.																
14 Jojo x Hoh 4465	11	n.s.	****	****	****	****	n.s.	**	n.s.	***	****														
62 Jojo x C. Fruchtbar	12	****	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	****	*	n.s.	****														
76 Jojo x Fellenberg	13	****	n.s.	*	**																				
91 Jojo x Felsina	14	****	n.s.	**	****	****	*	n.s.	n.s.	n.s.	****	n.s.													
49 Jojo x Hanita	15	***	*	**	**	****	*	n.s.	n.s.	n.s.	**	*	***	n.s.	n.s.										
20 Jojo x Hauszweitsche, Typ Gunser	16	***	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	***	n.s.	n.s.										
31 Jojo x Hauszweitsche, Typ Schüfer	17	****	n.s.	****	n.s.	n.s.	**	**	n.s.																
33 Jojo x Jojo	18	****	n.s.	*	**	**	*	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	*								
51 Jojo x Katinka	19	****	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	****	n.s.	***	***	n.s.	n.s.	n.s.							
68 Jojo x Klon 108	20	****	n.s.	**	n.s.	n.s.	***	**	n.s.	n.s.	**	*													
43 Jojo x Klon 128	21	****	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	***	n.s.	n.s.	***	***	*	n.s.	**	**	n.s.					
14 Jojo x (Ort x Gerst 17)	22	n.s.	n.s.	*	n.s.	**	n.s.																		
77 Jojo x Presenta	23	****	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	**	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
47 Jojo x Zwintschers Frühe	24	****	n.s.	***	n.s.	n.s.	***	**	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.								
43 (Ort x Stan 34) x Hanita	25	****	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	*	n.s.	n.s.	***								
47 (Ort x Stan 34) x Jojo	26	****	**	**	****	****	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	***	***	***	***	***	***	n.s.

a Anzahl bewerteter Genotypen; Kreuzungskombinationen, bei denen weniger als 20 Hybriden bewertet werden konnten, sind kursiv markiert. Bei ihnen lassen sich statistisch nur wenige, aber dennoch einige Unterschiede zu anderen Nachkommenschaften gesichert nachweisen.

4.2.2.2 Resistenzdonoren

Ziel. Um die Hypersensibilität gegenüber PPV züchterisch zu nutzen, ist es notwendig, über geeignete Resistenzquellen zu verfügen. Ziel der Untersuchungen war es, die Eignung verschiedener hypersensibler Genotypen als Resistenzdonoren zu überprüfen.

Betrachtete Kreuzungskombinationen. Insgesamt wurden sechs verschiedene hypersensible Genotypen in Kreuzungen verwendet, deren Nachkommen auf Hypersensibilität getestet wurden. Sie sind in Tab. 4.2–3 aufgelistet. Die aus Hohenheim stammenden vier Hybriden reagieren gegenüber allen bislang getesteten Virusstämmen hypersensibel. Für die 'K4'-Abkömmlinge ist dies nicht der Fall. Am häufigsten wurde die Sorte 'Jojo', am zweithäufigsten der Zuchtklon 'Ort×Stan34' für Kreuzungen verwendet. Die anderen Genotypen fanden nur für einzelne Kreuzungskombinationen Verwendung (s. Tab. 4.2–1).

Tab. 4.2–3 Als Elternsorten verwendete hypersensible Genotypen und deren Abstammung

Genotyp	Abstammung	Herkunft
Jojo	Ortenauer×Stanley	Hohenheim
Ort×Stan34	Ortenauer×Stanley	Hohenheim
Ort×Gerst17	Ortenauer×Ruth Gerstetter	Hohenheim
Hoh 4465	(Ort×Stan34)×Hanita	Hohenheim
Klon 108	K4 (frei abgeblüht)	Aschersleben
Klon 128	K4 (frei abgeblüht)	Aschersleben

Betrachtet werden folgende Kreuzungskombinationen:

- 'Jojo'×'Hanita' (und reziprok) und 'Ort×Stan34'×'Hanita' sowie 'Jojo'×'Cacaks Fruchtbare' und 'Cacaks Fruchtbare'×'Ort×Stan34', um die Eignung der beiden hypersensiblen Genotypen 'Jojo' und 'Ort×Stan34' als Resistenzdonoren zu vergleichen;
- Kreuzungen von 'Jojo' mit allen anderen hypersensiblen Genotypen, um die Kom-

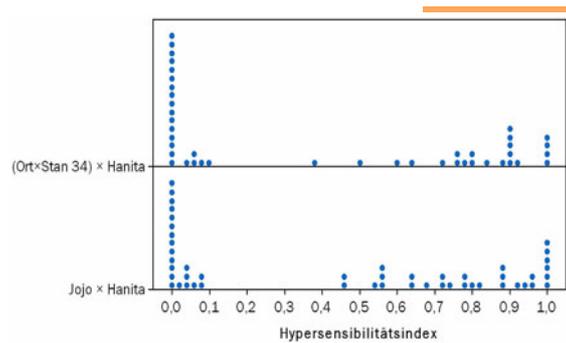


Abb. 4.2–5 Dotplot des HI der Kreuzungskombinationen 'Ort×Stan34'×'Hanita' und 'Jojo'×'Hanita'. Jeder Punkt repräsentiert den HI eines getesteten Genotyps.

binationsseignung der hypersensiblen Genotypen zu überprüfen.

Ergebnisse und abgeleitete Aussagen. Der Anteil hypersensibler Nachkommen lag bei der Kombination 'Jojo'×'Hanita' bei 59,2%, bei 'Hanita'×'Jojo' bei 51,9% und bei 'Ort×Stan34'×'Hanita' bei 48,8% (s. Tab. 4.2–1). Der Anteil hypersensibler Genotypen war damit im Vergleich zu anderen Kreuzungskombinationen in allen drei Kombinationen hoch. Es konnte kein Unterschied in der Lage des Medians zwischen den einzelnen Kreuzungskombinationen nachgewiesen werden (s. Tab. 4.2-2). Abb. 4.2–5 zeigt die Verteilung des HI bei zwei Kreuzungskombinationen mit jeweils 'Hanita' als einem und 'Ort×Stan34' bzw. 'Jojo' als anderem Elternteil. Es sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Nachkommenschaften erkennbar.

Aus der Kreuzung 'Jojo'×'Cacaks Fruchtbare' gingen 19,4%, aus der Kombination 'Cacaks Fruchtbare'×'Ort×Stan34' 23,3% hypersensible Genotypen hervor. Auch in diesem Fall unterschieden sich die Kreuzungsnachkommenschaften in der Lage des Medians der HI nicht signifikant voneinander. Der Anteil hypersensibler Nachkommen lag in beiden Fällen auf niedrigem Niveau (s. Abb. 4.2–6).

Vergleicht man die eben betrachteten Kreuzungskombinationen, so stellt man fest, dass in der Kombination mit 'Hanita' die Sorte 'Jojo', in der Kombination mit 'Cacaks Fruchtbare' der Zuchtklon 'Ort×Stan34' einen tendenziell höheren Anteil hypersensibler Genotypen bedingte,

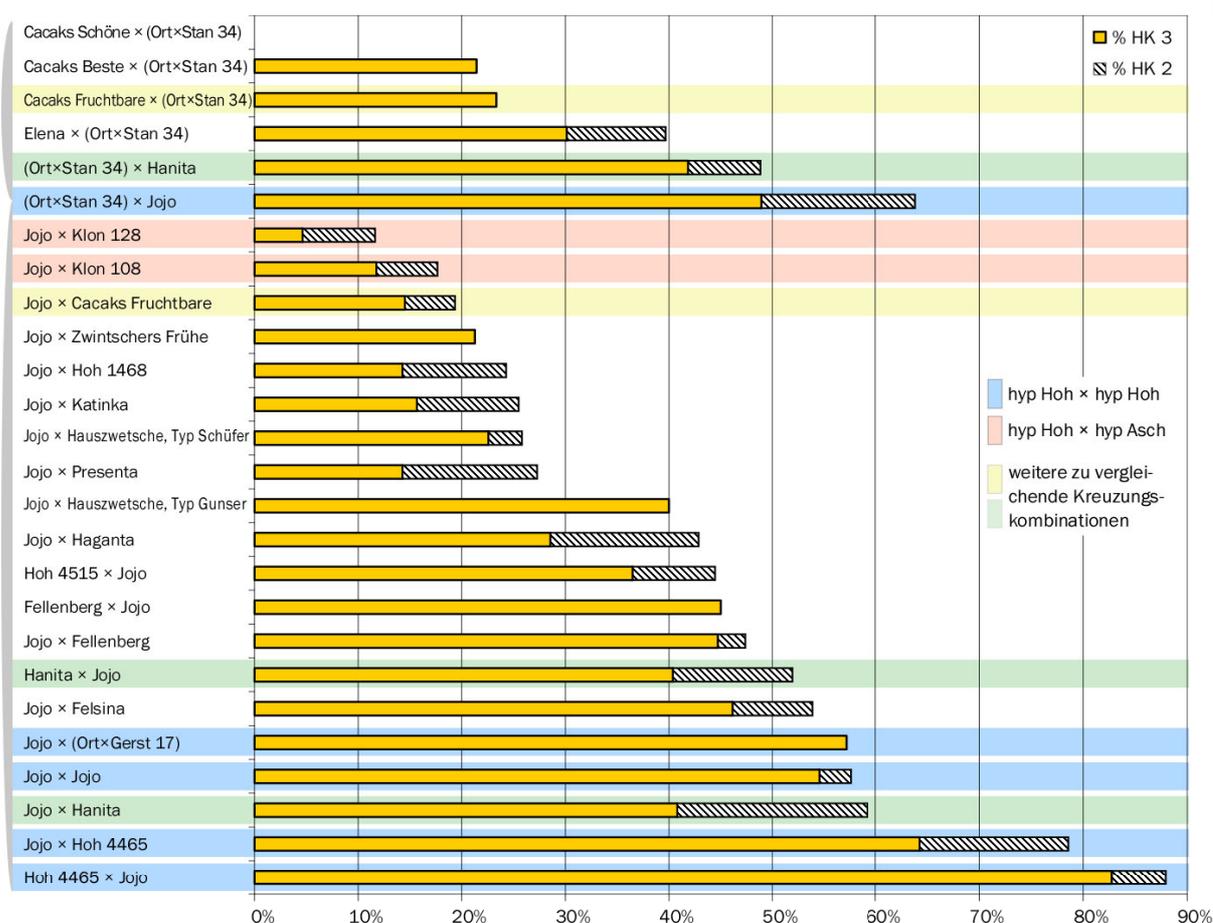


Abb. 4.2-6 Anteil der Genotypen mit HK 2 und 3 in den Nachkommenschaften der untersuchten Kreuzungskombinationen, geordnet nach der Resistenzquelle ('Ort×Stan 34' bzw. 'Jojo') und dem Prozentsatz hypersensibler Genotypen. Durch Farbrunterlegung hervorgehoben sind die Kreuzungskombinationen zwischen zwei hypersensiblen Genotypen (Kreuzungen aus zwei Genotypen Hohenheimer („hyp Hoh“, blau) bzw. Ascherslebener Herkunft („hyp Asch“, rot)) sowie Kreuzungskombinationen zweier anfälliger Sorten ('Hanita', grün, 'Cacaks Fruchtbare', gelb) mit jeweils 'Jojo' und 'Ort×Stan 34' als Resistenzdonor. Die Darstellung basiert auf den Angaben in Tab. 4.2-1 auf S. 91.

wobei die Unterschiede nicht signifikant waren. Daraus kann gefolgert werden, dass sich beide hypersensiblen Genotypen in gleicher Weise als Donoren für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus eignen.

Für die Kreuzungen hypersensibler Genotypen untereinander sind die Anteile hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften und die Ergebnisse der statistischen Auswertung in Tab. 4.2-4 zusammengefasst. In Abb. 4.2-6 sind sie farblich hervorgehoben und in Bezug zu den anderen untersuchten Kreuzungskombinationen gesetzt.

Den geringsten Anteil hypersensibler Nachkommen wiesen Kreuzungen mit den bei-

den 'K4'-Sämlingen 'Klon 108' und 'Klon 128' auf. Er lag jeweils deutlich unter 20% und zählte zu den niedrigsten Werten aller untersuchten Kreuzungskombinationen. Nur die Kombination 'Cacaks Schöne'×'Ort×Stan 34' hatte einen geringeren Anteil hypersensibler Nachkommen. Sämtliche Kreuzungskombinationen zweier hypersensibler Genotypen aus dem Hohenheimer Zuchtmaterial erbrachten dagegen stets mehr als 50% hypersensible Nachkommen. Zwischen diesen beiden Gruppen der Nachkommen von Kreuzungskombinationen Hohenheimer mit Ascherslebener Genotypen und Hohenheimer Hybriden untereinander bestanden signifikante Unterschiede. Die Nachkommen von Kreuzungen zwischen zwei hypersensiblen Genotypen des

Tab. 4.2-4 Anteil hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften von Kreuzungskombinationen mit zwei hypersensiblen Elternteilen (Auszug aus Tab. 4.2-1)

Nr.	Kreuzungskombination	Anzahl Genotypen	HK 2 und 3 (%) ^a
21	Jojo × Klon 128	43	11,6 (A)
20	Jojo × Klon 108	68	17,7 (A)
22	Jojo × (Ort × Gerst 17)	14	57,1 ^b
18	Jojo × Jojo	33	57,6 (B)
26	(Ort × Stan 34) × Jojo	47	63,8 (B)
11	Jojo × Hoh 4465	14	78,6 ^b
1	Hoh 4465 × Jojo	58	87,9 (C)

a Zwischen Kreuzungskombinationen mit den gleichen in Klammern gesetzten Großbuchstaben bestehen keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 4.2-2).

b Wegen der geringen Anzahl getesteter Hybriden wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Hohenheimer Genpools bildeten die Kreuzungen mit den höchsten Anteilen hypersensibler Genotypen aller untersuchten Kreuzungsnachkommenschaften. Bei Kreuzungen hypersensibler Hohenheimer Genotypen mit hypersensiblen Genotypen, die von 'K4' abstammen, war das Gegenteil der Fall. Exemplarisch ist dies in Abb. 4.2-2 auf S. 93 an der Häufigkeitsverteilung der HI der Kreuzungskombination 'Hoh 4465' × 'Jojo' und 'Jojo' × 'Klon 108' verdeutlicht. Der Anteil hypersensibler Genotypen war in der Nachkommenschaft erstgenannter Kreuzungskombination deutlich höher als in der Nachkommenschaft letztgenannter. Aus Abb. 4.2-3 (ebenfalls auf S. 93) wird ersichtlich, dass bei Kombinationen zweier hypersensibler Genotypen aus dem Hohenheimer Genpool mehr hypersensible als empfindliche Nachkommen auftraten und es sich bei Kreuzungen mit 'Klon 108' und 'Klon 128' umgekehrt verhielt.

Für die Züchtung eignen sich demnach Kombinationen zweier hypersensibler Genotypen, die aus Kreuzungen mit der Sorte 'Ortenauer' hervorgegangen sind, besser als Kombinationen mit Genotypen, deren Hypersensibilität auf Hybridisierungen mit der Sorte 'K4' zurückgeht.

Die in diesen beiden Gruppen von Resistenzdonoren vorliegende Hypersensibilität scheint jeweils weitgehend unabhängig voneinander vererbt zu werden. Nur so sind die niedrigen Anteile hypersensibler Genotypen in Kombinationen mit 'Klon 108' und 'Klon 128' zu erklären. Dieser Befund unterstützt die These, dass es sich bei der virusisolatspezifischen Hypersensibilität von 'K4' und der virusisolatunspezifischen von 'Jojo' und ihrem Geschwisterzuchtklon um zwei verschiedene Typen der Hypersensibilität handelt, die nicht denselben auslösenden Mechanismen folgen.

Ob es eine Pyramidisierung von möglicherweise verschiedenen Typen der Hypersensibilität gegenüber PPV gibt, die in verschiedenen Genotypen verankert sind, kann aus den vorliegenden Untersuchungen nicht geschlossen werden.

4.2.2.3 Kombinationseignung

Ziel. In Kapitel 4.2.1 auf S. 90 wurde bereits dargelegt, dass der Anteil hypersensibler Hybriden in einer Kreuzungsnachkommenschaft von den verwendeten Eltern abhängt, diese also im Hinblick auf die Vererbung der Hypersensibilität eine unterschiedliche Kombinationseignung aufweisen. Für den Züchter wie für den Genetiker ist es von vorrangigem Interesse, diese Kombinationseignung näher zu charakterisieren.

Betrachtete Kreuzungskombinationen. Für die Untersuchung der Kombinationseignung wurden sämtliche getesteten Kreuzungsnachkommenschaften betrachtet. Sie sind in Tab. 4.2-1 (S. 91) und Abb. 4.2-1 (S. 92) aufgeführt.

Ergebnisse und abgeleitete Aussagen. In Abb. 4.2-7 sind, analog zum vorhergehenden Unterkapitel, die für die Analyse der Kombinationseignung wesentlichen Daten zusammengestellt. Die Kreuzungskombinationen sind nach der verwendeten Hypersensibilitätsquelle ('Ort × Stan 34' bzw. 'Jojo') sortiert. Ersichtlich ist, dass der Prozentsatz hypersensibler Genotypen zwischen 0% und 87,9% schwankte. Nachfolgend werden nur Kombinationen betrachtet, von denen nicht beide Elternsorten hypersensibel gegenüber allen ge-

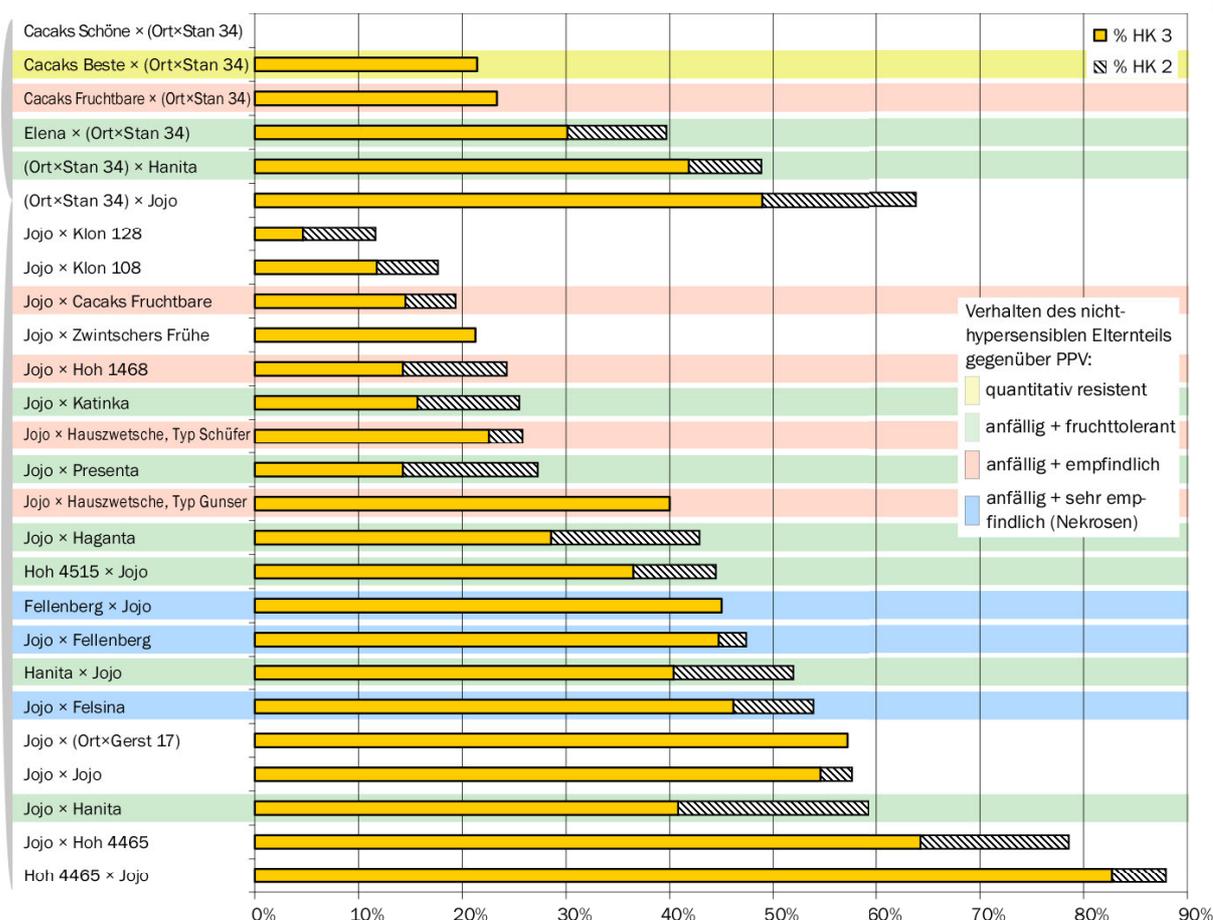


Abb. 4.2-7 Anteil der Genotypen mit HK 2 und 3 in den Nachkommenschaften der untersuchten Kreuzungskombinationen, geordnet nach der Resistenzquelle ('Ort×Stan 34' bzw. 'Jojo') und dem Prozentsatz hypersensibler Genotypen. Die Darstellung basiert auf den Angaben in Tab. 4.2-1 auf S. 91.

prüften PPV-Isolaten reagieren. Diese brachten stets einen sehr hohen Anteil hypersensibler Nachkommen hervor (s. Kapitel 4.2.2.2 „Resistenzdonoren“ auf S. 96).

Sowohl bei den Kreuzungskombinationen von 'Jojo' als auch von 'Ort×Stan34' mit einem nicht hypersensiblen Genotyp variierten die Anteile hypersensibler Hybriden in den Nachkommenschaften stark. Der Minimalwert bei einer Kreuzung mit 'Jojo' lag bei 11,6% (4,6% in HK 3 und 7,0% in HK 2) bei der Kreuzungskombination mit 'Klon 128'. Den höchsten Anteil wiesen mit 59,2% (40,8% in HK 3 und 18,4% in HK 2) Nachkommen der Kreuzung mit 'Hanita' als Vatersorte auf. Wurde 'Ort×Stan34' als Resistenzdonor verwendet, lag der niedrigste Anteil hypersensibler Genotypen bei 0% bei den Hybriden der Kreuzung mit 'Cacaks Schöne' als Muttersorte, der höchste bei 48,8% (41,9% in HK 3

und 7,0% in HK 2) bei Nachkommen der Kreuzung mit 'Hanita' als Vatersorte. Es ist zu berücksichtigen, dass bei der Kreuzungskombination mit 'Cacaks Schöne' nur 9 Genotypen ausgewertet werden konnten. Dass aus der Kreuzung dieser Sorte mit 'Ort×Stan34' keine hypersensiblen Genotypen hervorgehen können, kann aus den vorliegenden Ergebnissen daher nicht abgeleitet werden, es kann lediglich davon ausgegangen werden, dass ihr Anteil gering ist. Der zweitniedrigste Anteil hypersensibler Genotypen wurde mit 21,4% (gänzlich in HK 3) bei den Nachkommen der Kreuzung mit 'Cacaks Beste' beobachtet.

Vergleicht man die Kombinationen mit den jeweils niedrigsten oder höchsten Anteilen hypersensibler Genotypen untereinander, so lassen sich keine Unterschiede zwischen den Hybridisierungen eines nicht hypersensiblen Genotyps mit 'Jojo' und 'Ort×Stan34' nachweisen. Dage-

gen sind für Kombinationen jeder der beiden Resistenzdonoren mit nicht hypersensiblen Genotypen die Unterschiede in der Verteilung der HI zwischen den beiden Kreuzungskombinationen mit den niedrigsten und höchsten Anteilen hypersensibler Genotypen jeweils signifikant (s. Tab. 4.2–2 auf S. 95).

Deswegen kann gefolgert werden, dass bei Kreuzungen mit hypersensiblen Genotypen aus dem Hohenheimer Genpool die Wahl des nicht hypersensiblen Genotyps über den Anteil hypersensibler Nachkommen entscheidet.

Über die Kombinationseignung lassen sich folgende Aussagen treffen:

1 Kreuzungen mit PPV-anfälligen, stark blatt- und fruchtempfindlichen Sorten

Wurde 'Jojo' mit PPV-anfälligen Sorten gekreuzt, die nach Infektion mit PPV sehr starke Scharkasymptome entwickeln und in Extremfällen mit Rinden- und leichten Blattspaltennekrosen reagieren, war der Anteil hypersensibler Genotypen in der Nachkommenschaft stets sehr hoch. Bei 'Fellenberg' × 'Jojo' lag er bei 45%, bei der reziproken Kreuzung bei 47,4% und bei 'Jojo' × 'Felsina' bei 53,9%. Die Unterschiede zwischen diesen Kreuzungskombinationen sind nicht signifikant (s. Tab. 4.2–2). Für die züchterische Praxis bedeutet dies, dass sehr scharkasensible Sorten mit hoher Fruchtqualität wie die beiden genannten erfolversprechend in Resistenzzüchtungsprogrammen verwendet werden können. Womöglich kann die besondere Eignung dieser Sorten damit erklärt werden, dass in ihnen eine schwach ausgeprägte Hypersensibilität genetisch fixiert ist, die sich in Form schwacher Nekrosen nach massiver PPV-Infektion zeigt.

2 Kombinationen mit PPV-anfälligen, blattempfindlichen, fruchtoleranten Sorten

Wurden PPV-anfällige, fruchtolerante Sorten mit hypersensiblen Genotypen gekreuzt, variierte die Anzahl hypersensibler Nachkommen stark (s. Abb. 4.2–7). Der niedrigsten Wert lag mit 25,5% bei

'Jojo' × 'Katinka', der höchste mit 59,2% bei 'Jojo' × 'Hanita'. Der Unterschied in der Lage des Medians der HI ist hochsignifikant ($p < 0,01$) (s. Tab. 4.2–2). Die Nachkommen der Kombinationen mit 'Presenta', 'Elena', 'Haganta' und 'Hoh 4515' nahmen diesbezüglich eine Mittelstellung zwischen diesen beiden Extremen ein.

Hervorzuheben ist der hohe Anteil hypersensibler Genotypen bei Kreuzungen mit der Sorte 'Hanita'. Er liegt im selben Bereich wie derjenige bei Nachkommen aus Kreuzungen zweier hypersensibler Genotypen aus dem Hohenheimer Genpool. 'Hanita' vererbt ihre positiven Geschmackseigenschaften stabil an ihre Nachkommen. Daher ist sie in Resistenzzüchtungsprogrammen als vielversprechender Kreuzungspartner einzustufen.

3 Kombinationen mit PPV-anfälligen, blatt- und fruchtempfindlichen Sorten

Aus Kreuzungen mit scharkaanfälligen Sorten, die starke Blatt- und Fruchtssymptome zeigen, gingen Nachkommenschaften mit noch stärker variierendem Anteil hypersensibler Hybriden hervor. Den niedrigsten Anteil wies die Kombination 'Jojo' × 'Cacaks Fruchtbare' mit 19,4% auf, den höchsten 'Jojo' × 'Hauszwetsche, Typ Gunser' mit 40,0% (Unterschied in der Lage des Medians hochsignifikant, s. Tab. 4.2–2). Dazwischen lagen die Anteile bei den Kreuzungsnachkommenschaften mit 'Hoh 1468' und 'Hauszwetsche, Typ Schüfer'. Der Unterschied in der Lage des Medians des HI zwischen den beiden Typen der 'Hauszwetsche' ist nicht signifikant (s. Tab. 4.2–2).

Der Anteil hypersensibler Nachkommen aus Kreuzungen mit Sorten, die Fruchtssymptome zeigen (Ziffer 3), lag tendenziell niedriger als bei Kombinationen mit anfälligen, aber fruchtoleranten Sorten (Ziffer 2). Die Schwankungen zwischen den einzelnen Kombinationen waren aber bei beiden Sortengruppen hoch. Für die züchterische Praxis lassen sich daher keine Empfehlungen für eine der beiden

Sortengruppen ableiten. Die spezifische Kombinationseignung ist für jedes Sortenpaar zu prüfen.

4 Kombinationen mit quantitativ resistenten, toleranten Sorten

Es gibt nur sehr wenige Sorten, die als quantitativ resistent und tolerant eingestuft werden können (s. Kapitel 1.4.4.1 „Resistenzprüfung“ auf S. 24), zu ihnen zählt ‘Cacaks Beste’. Aus einer Kreuzung derselben mit ‘Ort×Stan 34’ als Vatersorte gingen 21,4% hypersensible Genotypen hervor. Dieser Wert lag deutlich unter dem Durchschnitt aus allen Kreuzungskombinationen (40,1%). Sämtliche Genotypen aus der genannten Kreuzungskombination, die nicht hypersensibel reagierten, zeigten deutliche PPV-Symptome auf der Blattspreite.

Da lediglich eine Kreuzungskombination mit einem quantitativ resistenten Genotyp untersucht werden konnte (und diese nur 14 Genotypen umfasste), lassen sich keine allgemeinen Rückschlüsse auf deren Eignung in der Züchtung auf Hypersensibilitätsresistenz ableiten. Es kann jedoch konstatiert werden, dass aus Kombinationen hypersensibler mit quantitativ resistenten Sorten nicht von vornherein mit einem hohen Anteil hypersensibler Nachkommen zu rechnen ist.

Einen hohen Anteil von stets über 50% hypersensibler Genotypen in der Nachkommenschaft zeigten Kreuzungen zwischen zwei hypersensiblen Genotypen, die auf die von ‘Ortenauer’ abgeleitete Hypersensibilität zurückzuführen ist. Auch zwischen diesen Kombinationen gab es Unterschiede in der Kombinationseignung. So gingen aus der Kreuzung ‘Jojo’×‘Hoh 4465’ 87,9% hypersensible Nachkommen hervor, während es bei ‘Jojo’×‘Jojo’ 57,6% und bei ‘Ort×Stan 34’×‘Jojo’ 63,8% waren. Die Unterschiede sind statistisch höchst signifikant ($p < 0,001$, s. Tab. 4.2–2).

Im Mittel reagierten 40,1% (32,7% in HK 3) der Nachkommen aller untersuchten Kreuzungskombinationen mit zumindest einem hy-

persensiblen Elternteil überempfindlich. Es kann daher festgestellt werden, dass der Züchtung auf diese Weise eine große Anzahl an Hybriden mit der gewünschten Eigenschaft zur Selektion zur Verfügung gestellt werden kann. Werden unter den ausgeführten Gesichtspunkten bestimmte Kreuzungskombinationen gewählt, lässt sich ein Anteil von deutlich über 50% hypersensibler Nachkommen erzielen. BIVOL et al. (1987 und 1989) berichteten von einer durchschnittlichen Vererbbarkeit der quantitativen Scharkaresistenz von 29,4% an die Nachkommen (s. Kapitel 1.4.4.2 „Vererbung“ auf S. 28). Im Vergleich dazu stellt die Nutzung der Hypersensibilitätsresistenz in der Züchtung eine deutliche Verbesserung dar.

HARTMANN (2001) stellt die von KEGLER et al. (1998) postulierte These, dass die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus monogen bedingt ist, in Frage. Seiner Ansicht nach könnten mehrere Gene für die Vererbung der Hypersensibilitätsresistenz verantwortlich sein, wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich um eine additive Genwirkung ein- und desselben Gens in der Pflanze handelt. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand über die Auslösung der Hypersensibilitätsreaktion (Erkennung des Virus durch ein Resistenzgenprodukt, s. Kapitel 1.5.1.3 „Auslösung der HR und genetische Grundlagen“ auf S. 35) ist es aber unwahrscheinlich, dass ein Resistenzgen erst wirksam wird, wenn es in mehreren Kopien im Genom vorliegt. Bereits eine Kopie des Resistenzgens müsste, sofern es transskribiert und translatiert wird, in der Lage sein, eine Hypersensibilitätsreaktion auszulösen. Eine entscheidende Rolle spielen vermutlich Gene, die an den ersten Schritten der HR, also der Signalerkennung und -transduktion beteiligt sind. Die nachfolgenden Schritte (z. B. *oxidative burst*, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, s. Kapitel 1.5.1.2 „Ablauf der HR“ auf S. 33) sind ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet und im pflanzlichen Stoffwechsel unabdingbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie in jedem Genotyp vollständig genetisch codiert sind.

Unter der Annahme, dass eine Genakkumulation nicht Ursache für die Hypersensibilitätsresistenz ist, kann eine monogen-dominante

Determinierung der Resistenz ausgeschlossen werden: Der Anteil hypersensibler Nachkommen ist nämlich sehr stark vom nicht hypersensiblen Kreuzungspartner abhängig. Wäre ein dominantes Allel für die Auslösung der HR verantwortlich, dürfte es keine derart großen Unterschiede zwischen den Kreuzungskombinationen geben. Zudem wäre es nicht erklärbar, dass aus zwei Genotypen, die nicht oder nur sehr schwach hypersensibel reagieren, eine stark hypersensible Hybride entstünde, wie dies bei der Sorte 'Jojo' der Fall ist.

Letzteres könnte hingegen mit einem monogen-rezessiven Erbgang erklärt werden. Auch die unterschiedliche Kombinationseignung verschiedener Kreuzungspartner ist beim hexaploiden Genom der Europäischen Pflaume damit in Einklang zu bringen. Allerdings ist das Auftreten verschiedener Hypersensibilitätsklassen, wie sie beobachtet werden konnten, mit diesem Erbgang kaum vereinbar.

Infolgedessen muss die Beteiligung mehrerer Gene oder zumindest Allele an der Ausprägung der Hypersensibilität angenommen werden. Dabei sind verschiedene Wechselwirkungen wie Suppression, Epistasie oder komplementäre Genwirkungen denkbar. Bereits bei der Beteiligung von zwei Genen an der Ausprägung der Hypersensibilität könnten sich bei einem hexaploiden Genom viele Phänotypen manifestieren. Auch multiple Allele kann nicht ausgeschlossen werden.

Wenngleich es ein breites Spektrum der Ausprägungsformen der Hypersensibilität gibt, so darf nicht übersehen werden, dass die Verteilung der HI in der Gesamtheit der Kreuzungsnachkommenschaften deutlich zwei Schwerpunkte erkennen lässt: Es dominieren die empfindlichen ($HI < 0,1$) und die hypersensiblen ($HI \geq 0,7$) Genotypen, während die Anzahl der intermediären Hybriden deutlich geringer ist. Dies deutet darauf hin, dass die Hypersensibilität prinzipiell von nur wenigen Genen bedingt wird. Denkbar wäre die Beteiligung von zwei Genen, einem Hauptgen und einem Nebengen, das die Wirkung des Hauptgens beeinflusst. Es könnte die Expressivität oder Penetranz des Hauptgens modifizieren. Bereits VANDERPLANK (1984) weist

anhand etlicher Beispiele bei landwirtschaftlichen Kulturen darauf hin, dass eine polygene Determinierung der Krankheitsresistenz bei Kulturpflanzen äußerst selten ist. Insbesondere Resistenzen, die sich mit der Gen-für-Gen-Hypothese (s. S. 35) erklären lassen, sind meist mono- und oligogen bedingt.

Die Analyse der Vererbung einer Eigenschaft basiert auf der Beobachtung des Phänotyps. Da dessen Ausprägung vom Testsystem abhängt, muss auch dieses in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden. Im vorliegenden Fall wurden die Genotypen mittels Inokulation durch Doppelpfropfung mit PPV inokuliert. Dabei konnten die in Kapitel 2 dargelegten Merkmalsausprägungen beobachtet werden. Hieraus wurde der Hypersensibilitätsindex abgeleitet, der zur Bildung von Hypersensibilitätsklassen herangezogen wurde. Hätte als Testsystem die künstliche Inokulation durch Blattläuse Verwendung gefunden, hätten sich womöglich nur zwei, maximal drei Klassen der Hypersensibilität ergeben:

- Hybriden, die nach Blattlausinokulation systemisch infiziert werden und PPV-Symptome zeigen,
- hypersensible Genotypen, die die Vermehrung des Virus in der Pflanze unterbinden und völlig symptomlos bleiben,
- ggf. schwach hypersensible Hybriden, die nicht zur Lokalisierung des Erregers befähigt sind und Blattspreiten- und Rindennekrosen zeigen.

Vergleiche der erhaltenen Ergebnisse mit gut untersuchten Hypersensibilitätsreaktionen bei Tomate oder Tabak sind deshalb nicht angebracht. Bei diesen Wirt-Pathogen-Interaktionen werden die Pflanzen in aller Regel nämlich durch Abreiben inokuliert. Mit dieser Methode kann die Europäische Pflaume prinzipiell nicht mit PPV inokuliert werden (s. Kapitel 1.3.1.6 „Übertragung und Verbreitung“ auf S. 8).

Über die Variabilität des Merkmals Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegen-

über PPV lassen sich aus den Untersuchungen folgende Aussagen ableiten:

- **Umweltvarianz**

Die Varianz, die durch Umweltfaktoren hervorgerufen wurde, war im verwendeten Testsystem gering. Dies ist daraus ersichtlich, dass die Pflanzen der Wiederholungen eines Genotyps stets gleichförmig reagierten (s. S. 45).

- **additive Varianz**

Nachkommen einer Kreuzungskombination wiesen mitunter einen höheren Hypersensibilitätsgrad auf als der hypersensible Elternteil. Ein Beispiel dafür ist die Entstehung der Sorte 'Jojo' aus einer Kreuzung des schwach hypersensiblen

Genotyps 'Ortenauer' und der quantitativ resistenten Sorte 'Stanley'. Aber auch Nachkommen der Sorte 'Jojo' können diese in ihrem Hypersensibilitätsgrad übertreffen (s. S. 53). Es steht also fest, dass es bei der Ausprägung der Hypersensibilität gegenüber PPV additive Effekte zwischen Allelen oder Genen geben muss.

Weitergehende Aussagen zur Vererbung der Hypersensibilität gegenüber PPV lassen sich aus den geschilderten Untersuchungen nicht ableiten. Hauptgrund ist die Hexaploidie des Genoms von *Prunus domestica*. Dennoch konnten für die züchterische Praxis wertvolle Hinweise zur Nutzung des auf Hypersensibilität beruhenden Resistenzmechanismus gewonnen werden.

4.3 Zusammenfassung

Der Anteil hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften mit jeweils mindestens einem hypersensiblen Elternteil schwankte zwischen 0% und 87,9%.

Die Vererbung der Hypersensibilität ist unabhängig von der Verwendung der Kreuzungspartner als Vater- oder Muttersorte. Eine kerngenomische Codierung der Eigenschaft kann angenommen werden.

Die Hohenheimer Zuchtklone 'Jojo' und 'Ort×Stan34' eignen sich beide gleich gut als Resistenzdonoren.

Die von den beiden genannten Genotypen determinierte Hypersensibilität wird signifikant besser vererbt als die in 'K4'-Nachkommen vorhandene. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die im Hohenheimer Genpool vorhandene, virusisolatunspezifische Hypersensibilitätsresistenz auf einem anderen molekularen Mechanismus basiert als die isolatspezifische der Hybride 'K4'.

Es gibt hinsichtlich des Anteils hypersensibler Hybriden in den Nachkommenschaften große Unterschiede in der Kombinationseignung verschiedener Genotypen. Auch scharkaanfällige Sorten können als Elternteil erfolgversprechend in der Züchtung auf Hypersensibilität eingesetzt werden. Insbesondere Kreuzungen mit Genotypen, die nach PPV-Inokulation mit leichten Rinden- und Blattspreitennekrosen reagieren, lassen in den Nachkommenschaften einen hohen Prozentsatz hypersensibler Genotypen erwarten.

Werden zwei hypersensible Sorten, deren Überempfindlichkeit auf die Sorte 'Ortenauer' zurückzuführen ist, miteinander gekreuzt, ergibt sich ein stabil hoher Anteil hypersensibler Nachkommen.

Die Hypersensibilität wird mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mono-, sondern oligogen vererbt.

5 Etablierung eines Systems zur Entwicklung von DNA-Markern für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV

Als Marker wird ein genetisches Element (Chromosomenabschnitt, Gen, Allel oder DNA-Sequenz) bezeichnet, dessen Merkmalsausprägung phänotypisch oder cytologisch erfasst oder das mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden kann und zusammen mit einer bestimmten Eigenschaft, die von eigentlichem Interesse ist, vererbt wird. Marker werden seit langem in der Pflanzenzüchtung genutzt, um in Nachkommenschaften eine möglichst frühzeitige und damit ressourcensparende Selektion von Genotypen zu ermöglichen, die die entsprechende Eigenschaft aufweisen. Molekulare Marker können Protein- oder DNA-Marker sein. DNA-Marker haben den Vorteil, unabhängig von der ontogenetischen Entwicklung der Pflanze und vom Organ, aus dem die der Untersuchung zugrundeliegende DNA gewonnen wird, nachweisbar zu sein (LINNERT und ODENBACH 1997).

Während in den diploiden *Prunus*-Arten *P. persica*, *P. armeniaca*, *P. dulcis* und mit Einschränkung *P. avium* in den zurückliegenden 15 Jahren intensiv nach DNA-Markern für verschiedene Eigenschaften gesucht wurde, gibt es kaum Berichte über vergleichbare Anstrengungen bei *P. domestica*. Dies liegt vornehmlich an ihrer Polyploidie. Das hexaploide Genom der Europäischen Pflaume erhöht den Arbeitsaufwand bei der Anwendung molekulargenetischer Methoden und erschwert das Auffinden von *quantitative trait loci* (QTLs), da geeignete statistische Aus-

wertungsverfahren für Populationen solch geringen Umfangs fehlen, wie sie in der Steinobstzüchtung möglich sind (DIRLEWANGER et al. 2004, DECROOCCQ et al. 2004).

DNA-Marker für quantitative PPV-Resistenz wurden bislang nur für *P. armeniaca* und *P. davidiana*, einer dem Pfirsich nahestehenden Art, die für interspezifische Hybridisierungen mit *P. persica* verwendet wurde, entwickelt (HURTADO et al. 2002, SALAVA et al. 2002, VILANOVA et al. 2003, DONDINI et al. 2004, DECROOCCQ et al. 2005). Hypersensibilitätsresistenz gegenüber PPV ist in den genannten Arten nicht bekannt, demzufolge liegen keine Berichte über DNA-Marker für diese Eigenschaft vor.

Molekulargenetische Untersuchungen bei der Europäischen Pflaume beschränkten sich bislang auf die Untersuchung ihrer genetischen Variabilität zur Prüfung verwandtschaftlicher Beziehungen und zur Unterscheidung verschiedener Genotypen (DNA-Fingerprinting) (MALUSA und MARCHESINI 1993, GREGOR et al. 1994, BADENES und PARFITT 1995, CASAS et al. 1999, HEINKEL et al. 2000, BOUHADIDA et al. 2004).

Ziel der nachfolgend dargestellten Untersuchungen war es, durch sinnvolle Kombination etablierter Methoden ein System zu entwickeln, mit dem sich DNA-Marker für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV entwickeln lassen.

5.1 Strategie zum Auffinden von DNA-Markern für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume

Es gibt eine Reihe von DNA-Markern, die je nach Anwendungsgebiet spezifische Vor- und Nachteile aufweisen (LINNERT und ODENBACH 1997, HOFFMANN ET AL. 1997). VOS et al. (1995) stellten die AFLP (amplified fragment length polymorphism)-Methode vor. Dieses Verfahren läuft in folgenden Schritten ab:

- 1 Enzymatischer Verdau der DNA und Ligation von Oligonucleotidadaptoren an die Schnittstellen,
- 2 selektive Amplifikation einer Auswahl der Restriktionsfragmente und
- 3 Visualisierung der amplifizierten Fragmente über Gelelektrophorese.

Es ist insbesondere für Genome geeignet, deren Sequenzen weitgehend unbekannt sind, weil durch die Ligation von Adaptoren an die DNA-Fragmente bekannte Sequenzen als Primerbindungsstellen eingeführt werden. Es führt zu einer Vielzahl von amplifizierten Fragmenten, was Voraussetzung für das Auffinden von Polymorphismen im Bandenmuster ist. Die Anzahl der verschiedenen Fragmente, die pro Primerpaar amplifiziert werden, kann durch einfaches, systematisches Austauschen eines (oder beider) Primer verringert werden, um die Detektion zu erleichtern. Die Verwendung von AFLPs vereint die Zuverlässigkeit der RFLP (restriction fragment length polymorphism)-Methode mit den Vorteilen des RAPD (random amplified polymorphic DNA)-Verfahrens (VOS et al. 1995, MUELLER und WOLFENBARGER 1999).

Aus diesen Gründen wurde für die Entwicklung von DNA-Markern bei der Europäischen Pflaume das AFLP-Verfahren angewandt.

Marker zeigen genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Genotypen. Daher muss für ihre Entwicklung eine Population von Genotypen vorhanden sein, die hinsichtlich des Merkmals spaltet, für das Marker gesucht werden sollen. Im vorliegenden Fall wurde eine 131 Indivi-

duen zählende Nachkommenschaft der Kreuzungskombination 'Jojo'×'Felsina' verwendet. Die Anzahl der Individuen ist ähnlich hoch wie bei vergleichbaren Studien. Beispielsweise verwendeten DECROOCQ et al. (2005) eine Nachkommenschaft von 77 Genotypen zur Entwicklung von Markern für PPV-Resistenz bei diploiden interspezifischen Hybriden zwischen *Prunus persica* und *Prunus davidiana*.

Um genotypbedingte Unterschiede, die nicht in Zusammenhang mit der Ausprägung der Hypersensibilität gegenüber PPV stehen, möglichst auszuschließen, wurde die *bulk segregant analysis* (BSA) (MICHELMORE et al. 1991) angewandt. Aus der zu untersuchenden Nachkommenschaft wurden jene Genotypen ausgewählt, die am stärksten hypersensibel und am empfindlichsten gegenüber PPV reagierten, und daraus DNA extrahiert. Die Individuen mit extremen Ausprägungsformen des Merkmals bildeten jeweils einen Pool oder *bulk*. Die DNA der Genotypen eines jeden *bulks* wurde zu gleichen Anteilen gemischt. Dieses Verfahren hat sich bei vergleichbaren Problemstellungen bewährt (BADENES et al. 2000, BALLESTER et al. 2001). Die Pools bestehen also aus Individuen, die sich im wesentlichen nur in der Ausprägungsform des betreffenden Merkmals gleichen, im vorliegenden Fall also entweder hypersensibel oder sensibel sind. Die anderen in den Genotypen erblich festgelegten Eigenschaften (wie etwa die Wuchsstärke oder die Fruchtgröße) sind innerhalb des Pools randomisiert verteilt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die *bulks* untereinander im Hinblick auf die meisten anderen Merkmale nicht oder nur geringfügig genetisch unterscheiden, so dass im DNA-Bandenmuster auftretende Unterschiede zwischen den Pools mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Merkmal in Zusammenhang stehen, auf Grund dessen die Einteilung der *bulks* vorgenommen wurde.

5.2 Suche nach DNA-Markern für die Hypersensibilität mittels BSA und AFLP

Material und Methoden

Verwendete Kreuzungspopulation und Bildung der bulks. Für die Erarbeitung eines Systems zur Suche nach DNA-Markern für die Hypersensibilität wurde die Kreuzungskombination 'Jojo' × 'Felsina' mit 131 Nachkommen ausgewählt. Die einzelnen Genotypen wurden wie in Kapitel 2 „Ausprägungsformen der Hypersensibilität gegenüber PPV“ auf S. 41 beschrieben auf Hypersensibilität getestet. 91 Genotypen konnten eindeutig bewertet werden. 46,2% der bewerteten Genotypen wurden HK 3, 41,8% HK 0 zugeordnet. Aus diesen beiden extremen Gruppen wurden je zwei bulks gebildet: Die sieben Genotypen mit der stärksten Hypersensibilitätsreaktion wurden zum bulk H, fünf weitere Genotypen der HK 3 zum bulk nH (normal hypersensibel) zusammengefasst. Die zehn empfindlichsten Genotypen wurden im bulk S, fünf weitere Genotypen der HK 0 im bulk nS (normal sensibel) gruppiert. Auf diese Weise war ein zusätzlicher Informationsgewinn möglich, da sowohl Polymorphismen zwischen den beiden bulks mit Genotypen aus einer Hypersensibilitätsklasse als auch zwischen denjenigen der beiden extremen HK detektiert werden konnten.

Auch MICHELMORE et al. (1991) verwendeten bei der Markersuche eine ungleiche Anzahl an Individuen pro bulk. Die Autoren zeigen zudem, dass die BSA-Methode auch mit wenigen Individuen pro bulk (wie im vorliegenden Fall) erfolgversprechend einsetzbar ist.

DNA-Extraktion. Ende Juni 2003 wurden den Sämlingsbäumen aller 131 Kreuzungskombinationen sowie dreijährigen Bäumen der Elternsorten 'Jojo' (hypersensibel) und 'Felsina' (sensibel) junge Blätter entnommen und für drei Monate bei -20°C gelagert. Die DNA-Extraktion aus den Blättern erfolgte nach der von LEFORT und DOUGLAS (1999) beschriebenen Methode in den Labors des Fachgebiets Virologie der Universität Hohenheim. Die isolierte DNA wurde in $50\mu\text{l}$ TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH

8,0) aufgenommen und bei -20°C für bis zu fünf Monate aufbewahrt. Die Qualität und Quantität der isolierten DNA wurde UV-spektroskopisch und über Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu wurde die Absorption einer DNA-Lösung in reinem Wasser bei den Wellenlängen $\lambda_1=260\text{ nm}$ und $\lambda_2=280\text{ nm}$ gemessen, daraus die Konzentration der DNA errechnet und auf Verunreinigung mit Proteinen überprüft. Hierzu wurde ein Ultrospec 3000 Spektrometer der Fa. Pharmacia Biotech (Cambridge, UK) verwendet. Es wurden DNA-Ausbeuten von etwa 50–150 $\mu\text{g/g}$ Blattfrischsubstanz erzielt.

AFLP. Die nachfolgend beschriebene Methode ist eine Modifikation der von VOS et al. (1995) beschriebenen. Abgewandelt wurden die Bedingungen für den enzymatischen Verdau, die PCR und die Polyacrylamidgelelektrophorese sowie die Auswahl an Primern. Die Untersuchungen wurden an der Abteilung „Interactions Plantes–Virus“ des Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Bordeaux Aquitaine (Frankreich) im Jahr 2003 durchgeführt.

Die DNA der Elternsorten und derjenigen Genotypen, die für die bulks verwendet wurden, wurde mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Quantität der isolierten DNA wurde über Agarosegelelektrophorese überprüft. λ -Phagen-DNA verschiedener Konzentration wurde als Standard neben je ein Aliquot der einzelnen DNA-Proben auf ein Agarosegel (1% Agarose in TAE-Puffer (40mM Tris, 1mM EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20mM Eisessig), 0,0016% Ethidiumbromid) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die aufgetragene DNA wanderte in TAE-Puffer im elektrischen Gleichspannungsfeld (80V) entsprechend ihrer Größe und Ladung. DNA der einzelnen Genotypen wurde so zu einem Gemisch der bulks kombiniert, dass die DNA der einzelnen Genotypen zu gleichen Massenanteilen vertreten war.

enzymatischer Verdau

Je 50 ng des DNA-Gemisches eines *bulks* wurden eine Stunde lang bei 37°C mit den Enzymen EcoRI (Amersham Pharmacia, Piscataway, USA) und MseI (New England Biolabs, Beverly, USA) (je 2 U/Ansatz) in OFA-Puffer (Amersham Pharmacia) in einem Gesamtvolumen von 17,5 µl unter mehrmaligem kurzen Schütteln inkubiert. Insgesamt wurden sieben Ansätze behandelt (Jojo, Felsina, H, nH, S, nS, Negativkontrolle (ohne DNA)).

Ligation der Adapter

Zur Ligation wurden folgende Adapter verwendet: EcoRI-Adapter (5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3'; 3' - CAT CTG ACG CAT GGT TAA - 5') und MseI-Adapter (5' - GAC GAT GAG TCC TGA G - 3'; 3' - TAC TCA GGA CTC AT - 5'). 7,5 ng der enzymatisch verdauten DNA wurden im Ligationsansatz (2,5 pM EcoRI-Adapter, 25 pM MseI-Adapter, 4 mM ATP (Promega, Madison, USA), 0,75 U/µl T4 DNA-Ligase (USB, Cleveland, USA)) unter mehrmaligem Schütteln für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

PCR 1 (pre-amplification reaction)

1 µl der ligierten DNA-Fragmente wurde als Template in den Ansatz für die PCR 1 eingesetzt. Dieser Bestand aus 0,3 µM eines jeden Primers, 0,2 mM dNTPs (Sigma), 2 mM MgCl₂ (Sigma) und 0,8 U Taq-Polymerase (Sigma) in einem Volumen von 40 µl in PCR-Puffer (Sigma). Es wurden folgende Primerpaare verwendet: (a) Primer_{EcoRI+A} (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') und Primer_{MseI+C} (5'-GATGAGTCCTGAGTAC-3'), (b) Primer_{EcoRI+C} und Primer_{MseI+T}. Sie wiesen am 3'-Ende jeweils einen Überhang von einem Nucleotid auf (farbig markiert), das über den Adapter und die Sequenz der Restriktionsschnittstelle hinaus in das unbekannte Genom von *P. domestica* hineinreichte. Die Primer wurden von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Das Temperaturprofil für die PCR 1 ist aus Tab. 5.2-1 ersichtlich. Für diese Amplifikation (und die PCR 2) wurde ein GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet.

Tab. 5.2-1 Bedingungen für die PCR 1

	T [°C]	t [sec]
Denaturierung	95	120
1 Denaturierung	95	30
2 Annealing	56	30
3 Extension	72	60
Final extension	72	420
Anzahl der Zyklen (1-3):	28	

Der Erfolg der PCR wurde durch Gelelektrophorese (1,5% Agarose) überprüft. Die PCR-Produkte wurden bei -20°C aufbewahrt.

PCR 2

1 µl des 1:30 verdünnten Produkts der PCR 1 wurde für den selektiveren Amplifikationsschritt, die PCR 2, mit einem Überhang an den Primern von zwei oder drei Nucleotiden verwendet (+2- bzw. +3-Primer). Der jeweilige EcoRI-Primer wurde 0,25 µM, der jeweilige MseI-Primer 0,3 µM in das PCR-Reaktionsgemisch eingesetzt. Die Konzentrationen der übrigen Bestandteile entsprachen den bei der PCR 1 verwendeten. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl.

Für die Amplifikation wurde ein modifiziertes Touchdown-PCR-Verfahren (DON et al. 1991) angewandt, um den Anteil der Fragmente im Gemisch der Amplifikationsprodukte, die durch unspezifische Basenpaarung der Primer entstanden sind, zu minimieren. Die Annealingtemperatur wurde während der ersten 13 PCR-Zyklen um jeweils 0,7 K erniedrigt. Die entsprechenden Daten sind in Tab. 5.2-2 zusammengestellt.

Insgesamt wurden 336 verschiedene Primerkombinationen verwendet (s. Abb. 5.2-1). Teilweise hatten die Primer (synthetisiert von MWG Biotech) einen Überhang von 2, teilweise von 3 Basen.

Der Erfolg der PCR wurde wiederum durch Gelelektrophorese (1,5% Agarose) überprüft.

Die PCR 2 wurde zunächst nur mit der DNA durchgeführt, die auf die vier *bulks* zurückging, nicht mit derjenigen der Elternsorten.

Tab. 5.2-2 Bedingungen für die PCR 2

	T [°C]	t [sec]
Denaturierung	95	120
1 Denaturierung	95	30
2 Annealing ^a	65-56,6	30
3 Extension	72	60
4 Denaturierung	94	30
5 Annealing	56	30
6 Extension	72	60
Final extension	72	420
Anzahl der Zyklen (1-3):	13 ^a	
Anzahl der Zyklen (4-6):	30	

a Die Annealingtemperatur wurde pro Zyklus um 0,7K erniedrigt.

Polyacrylamidgelelektrophorese. Zu den PCR-Produkten wurde das gleiche Volumen einer Lösung aus 95% Formamid, 0,05% Bromphenolblau und 0,05% Xylencyanol in 10mM NaOH gegeben. Die Gefäße wurden zehn Minuten lang geschüttelt, danach fünf Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Je 3,5µl pro PCR-Produkt wurden auf denaturierende Polyacrylamidgele (4,5%, 30×45cm²) so aufgetragen, dass die auf die vier bulks zurückgehenden Gemische nebeneinander lagen. Die DNA-Fragmente wurden bei 80W (3500V, 200mA) 105 Minuten elektrophoretisch getrennt. Abschließend wurden die Gele einer Silbernitratfärbung unterzogen. Die bei diesen Schritten verwendeten Methoden sind von CHALHOUB et al. (1997) beschrieben. Die gefärbten und getrockneten Gele wurden gescannt und mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop 6.0 ausgewertet.

Verifizierung beobachteter Polymorphismen. War eine Bande nur in den bulks aus entweder den hypersensiblen oder den empfindlichen Genotypen sichtbar, wurde die DNA der Bande aus dem Gel extrahiert und mit ihr als Template die PCR 2 wiederholt. Dazu wurden 3µl nuclease-freies Wasser auf die Bande pipettiert und nach 10 bis 15 Minuten zum nicht verdunsteten Rest weitere 2µl Wasser hinzugegeben. 2µl wurden abgezogen und in den 40µl-PCR-Ansatz überführt. Zusätzlich wurde das Amplifikat aus PCR

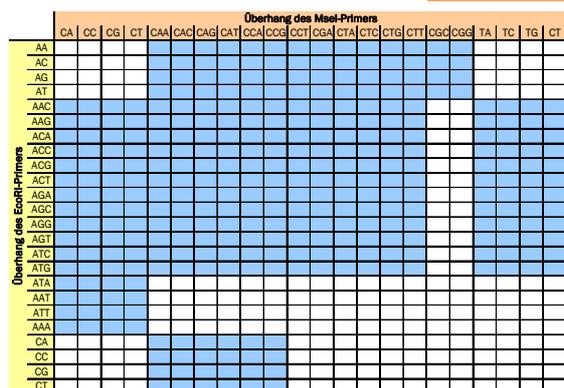


Abb. 5.2-1 In der PCR 2 verwendete Primerkombinationen (blau hinterlegt). Angegeben sind nur die fragmentspezifischen Überhänge am 3'-Ende der Primer.

1, das auf die Elternsorten 'Jojo' und 'Felsina' zurückging, für die PCR 2 verwendet. Die PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt.

Die Banden wurden im weiteren Verlauf nur dann weiter verwendet, wenn die in den bulks hypersensibler Genotypen aufgetretenen Banden auch im 'Jojo'- bzw. wenn die in den bulks sensibler Genotypen aufgetretenen Banden zugleich im 'Felsina'-Amplifikat sichtbar waren. Mit dieser Vorgehensweise war es möglich, die Zahl relevanter Banden um ca. die Hälfte zu reduzieren.

Sequenzierung relevanter DNA-Fragmente. Fragmente, die nur in hypersensiblen oder sensiblen Genotypen nachweisbar waren, wurden sequenziert. Die nachfolgende Beschreibung bezieht sich auf die Vorgehensweise zur Sequenzierung eines Fragments. Sie wurde für jedes Fragment in gleicher Weise durchgeführt. Fragmente, die in den bulks H und nH auftraten, wurden mit „Hyp+Nr.“, solche, die im bulk H eine sehr starke Bande und in nH eine schwache Bande ausprägten, mit „Mix+Nr.“ und solche, die in den bulks S und nS auftraten, mit „Sen+Nr.“ bezeichnet.

20µl des PCR-Produkts, das mit der aus dem Polyacrylamidgel extrahierten DNA als Template gewonnen worden war, wurden für eine Stunde bei 72°C inkubiert, um Poly-A-Überhänge an den amplifizierten Fragmenten zu erhalten. Nachfolgend wurde das PCR-Produkt

mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt, in 30 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und im Kühlschrank gelagert. Die Fragmente wurden nach Herstellerangaben über Nacht bei 4 °C in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) ligiert (2,5 µl Ligationspuffer, 1,5 µl DNA, 0,5 µl pGEM-T Easy Vektor, 0,5 µl T4-DNA-Ligase).

Anschließend wurden die Vektor-Plasmide in kompetente Bakterien (*Escherichia coli*, Stamm XL1) eingeschleußt. 1 bis 2 µl der ligierten Vektor-Plasmide wurden zu 20 µl Glycerin (10%) und 20 µl Bakterien gegeben. Die Bakterien wurden durch Elektroporation transformiert (Spannung 1,8 kV). Unmittelbar danach wurden zum Gemisch 300 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) hinzugegeben und dieses 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension in eine Petrischale mit LB-Medium (1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 17 mM NaCl, 50 µg/ml Ampicillin, 1,5% Agar-Agar) ausplattiert. Auf dem Medium in den Petrischalen (Ø 10 cm) waren zuvor 20 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 200 mM) und 20 µl 5-Brom-4-chlor-3-indol-β-D-galactopyranosid (X-Gal, 50 mM) ausgestrichen worden. Die Bakterien wurden bei 37 °C bebrütet. Nach ca. 24 Stunden waren Bakterienkolonien herangewachsen. Zehn weiß gefärbte Kolonien wurden mit Pipettenspitzen aufgenommen und in einen PCR-Ansatz (wie bei PCR 2, aber mit Primern der PCR 1) überführt.

Die PCR auf die Bakterienkolonien erfolgte wie aus Tab. 5.2–2 ersichtlich. Die PCR-Produkte, die auf verschiedene Bakterienkolonien zurückgingen, wurden zusammen mit den Amplifikaten aus der PCR 2, in denen die Polymorphismen detektiert worden waren, auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und durch Silbernitratfärbung visualisiert (s. o.). So konnte überprüft werden, ob das in die Vektoren ligierte Fragment demjenigen entsprach, welches für das Auftreten des Polymorphismus verantwortlich war.

Jeweils zwei Bakterienkolonien, die das gewünschte Insert im Vektor enthielten, wurden

über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit 0,25 µg/ml Ampicillin vermehrt. Mit dem Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) wurden aus den Bakterien die Plasmide isoliert. Die Inserts wurden sequenziert (Fa. AGOWA, Berlin).

Ergebnisse

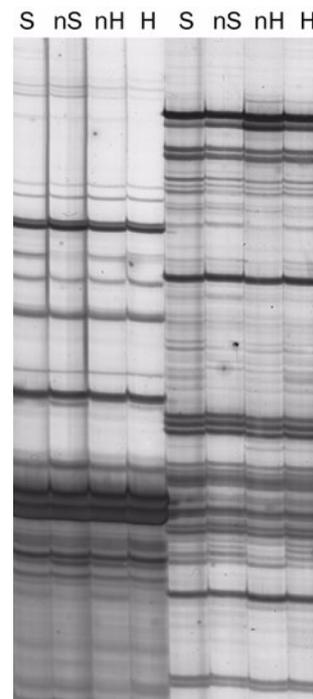


Abb. 5.2–2 Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel. Die Spalten sind mit den Abkürzungen der bulks bezeichnet. Die vier linken Spalten sind Produkte der PCR 2 mit den Primerkombinationen EcoRI-AAG/MseI-CA, die vier rechten Spalten gehen auf die Primerkombinationen EcoRI-AAG/MseI-CCA zurück. Deutlich erkennbar ist, dass die Bandendichte niedriger ist, wenn zwei +3-Primer kombiniert werden.

In allen bulks konnte mit jeder der in Abb. 5.2–1 dargestellten Primerkombinationen eine Vielzahl an Banden amplifiziert werden. Die meisten Fragmente waren zwischen 100 und 500 bp lang. Wurden Primer mit zwei Basen Überhang mit Primern mit drei Basen Überhang kombiniert, war der Abstand der Banden auf dem Gel teilweise so gering, dass eine Auswertung in den betreffenden Gelabschnitten nicht möglich war (s. Abb. 5.2–2). Daher wurde nachfolgend jeweils der entsprechende +2-Primer mit den vier möglichen

dass mögliche Polymorphismen überdeckt wurden. Deshalb empfiehlt es sich, bei der Europäischen Pflaume zwei +3-Primer zu verwenden. Dieser Unterschied zwischen verschiedenen *Prunus*-Arten ist dadurch erklärbar, dass Aprikose und Pfirsich ein diploides Genom besitzen, die allopolyploide Europäische Pflaume hingegen ein hexaploides.

Die Bildung von zwei getrennten *bulks* je Phänotypvariante leistete einen wertvollen Beitrag dazu, die Zahl der polymorphen Banden zu reduzieren, die nicht mit der Hypersensibilität in Verbindung stehen. Nur solche Fragmente, die in beiden *bulks* einer Phänotypausprägung sowie beim Elternteil mit der entsprechenden Merkmalsausprägung beobachtet werden konnten, wurden im weiteren Verlauf der Arbeiten verwendet.

Dass zwischen den Fragmenten keine Homologien zu genomischen Sequenzen aufgefunden wurden, die in Zusammenhang mit Pathogenabwehr stehen, ist nachvollziehbar: Mit der verwendeten AFLP-Methode werden in keiner Weise DNA-Sequenzen bevorzugt amplifiziert, die funktional in Zusammenhang mit der Eigenschaft stehen, für die DNA-Marker entwickelt werden sollen. Die Fragmente stehen bestenfalls in lokalem Zusammenhang zu Sequenzen, die mit der betrachteten Eigenschaft in Verbindung stehen.

HAYES und SAGHAI MAROOF (2000) nutzten bei Untersuchungen zur Virusresistenz bei der Sojabohne ebenfalls die *bulk segregant analysis* und die AFLP-Methode. Jedoch verwendeten sie ein modifiziertes AFLP-Protokoll: In der PCR 2 setzten sie nicht zwei Primer ein, die an die beiden Adapter binden, sondern nur einen der beiden und statt des zweiten einen degenerierten Primer, der an stark konservierte Sequenzen in der NBS-Domäne verschiedener Resistenzgene bindet. Auf diese Weise konnten sie Marker entwickeln, die unmittelbar Sequenzen von Resistenzgenen enthielten. CALENGE et al. (2005) gelang es mit der beschriebenen Methode, die NBS-profiling genannt wird, *resistance gene analogues* (RGA) beim Apfel ausfindig zu machen. Die RGAs konnten sie in der Nähe von Majorgenen und QTLs für Mehltau- und Schorfresistenz lokalisieren. Sie könnten als sog. RGA-Marker für die markergestützte Selektion Bedeutung erlangen.

Ein ähnlicher methodischer Ansatz könnte auch bei der Suche nach molekularen Markern für die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV vielversprechend eingesetzt werden: Die Anzahl der amplifizierten Banden ist bei der verwendeten AFLP-Standard-Methode sehr hoch, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch bei Einsatz nur eines Primers, der an einen der beiden eingeführten Adapter bindet, eine ausreichend hohe Anzahl an Fragmenten amplifiziert werden kann.

5.3 Umwandlung von AFLP-Markern in PCR-Marker

Um die Eignung der in der *bulk segregant analysis* aufgetretenen AFLP-Marker abzuschätzen, muss überprüft werden, ob die entsprechenden Bande in allen hypersensiblen bzw. empfindlichen Genotypen auftritt. Während die AFLP-Methode für die Suche nach Polymorphismen in Genomen sehr gut geeignet ist, deren Sequenz weitgehend unbekannt ist und/oder die sehr groß sind (Polyploidie), hat sie Nachteile bei einem Massenscreening, da sie aufwendig ist:

- Es muss sehr reine DNA vorliegen.
- Ein enzymatischer Verdau und die Ligation der Adapter muss der PCR vorangeschaltet werden.
- Es sind zwei getrennte PCR-Schritte notwendig.
- Die Auftrennung der amplifizierten Fragmente muss in Polyacrylamidgelen erfolgen.

Aus diesen Gründen ist es sinnvoll, AFLP-Marker in einfach zu handhabende PCR-Marker zu überführen. PARAN und MICHELMORE (1993) entwickelten ein Verfahren, um RAPD-Marker in SCAR (sequence characterized amplified region)-Marker zu überführen. Dabei werden Primer verwendet, die wie bei der PCR nur das Fragment amplifizieren, das den beobachteten Polymorphismus bedingt. Alle anderen Fragmente, die bei der RAPD-Methode (wie auch bei der AFLP-Methode) auftreten, werden nicht vervielfältigt. Deshalb kann das PCR-Produkt auch auf den niedrigauflösenden Agarosegelen elektrophoretisch getrennt werden.

Nachfolgend soll eine Vorgehensweise für die Umwandlung von AFLP-Marker in einfacher zu handhabende, rein PCR-basierte Marker für *Prunus domestica* beschrieben werden. Die Ergebnisse der Einzelschritte sind unmittelbar Entscheidungsgrundlage über die Auswahl der weiteren Methoden. Diese Schritte werden daher in kurzen, in sich abgeschlossenen Einheiten nacheinander dargestellt. Die Arbeiten wurden im Labor des Fachgebiets Virologie durchgeführt.

5.3.1 Design von Primern für einzelne AFLP-Fragmente

Material und Methoden

Primerdesign und PCR. Für vier der Fragmente, die Polymorphismen verursachten und deren Sequenzen ermittelt worden waren (s. voranstehendes Kapitel), wurden spezifische Primer synthetisiert. Die Primersequenz wurde unter Zuhilfenahme der Software Vector NTI Advance™ (Invitrogen, Karlsruhe) ermittelt. Die Primer wurden von der Fa. Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert. Die betreffenden AFLP-Fragmente, die verwendeten Primer und die Annealingtemperatur, die bei der PCR jeweils verwendet wurde, sind in Tab. 5.3–1 angegeben.

Tab. 5.3–1 Für die Amplifizierung verschiedener AFLP-Fragmente verwendete Primer (angegeben jeweils in 5'→3'-Richtung)

Fragment / Annealing-T ^a	Sense-Primer (S) Antisense-Primer (AS)
Hyp 1 (50 °C)	S: AGATGATCGGTTTCCAC AS: TTTGGATTAGGGGTGGGC
Hyp 16 (55 °C)	S: TTAACATGAGAGAGAGAG AGAGAAGGC AS: GAATTCATCGAAGGCCAAG CATCCC
Hyp 22 (57,5 °C)	S: TTTTGACCAACTAGGTGA ATTATTC AS: CGAAAGCTAGCACGCCATG
Hyp 23 (45 °C)	S: GAATTCATCAATAAGCAA GTATG AS: TTAACAACGTTTTGCCTC

a Annealingtemperatur, die in der PCR für die Amplifikation dieses Fragments verwendet wurde.

Als Template für die PCR wurde die DNA der Elternsorten sowie diejenige der vier *bulks* verwendet. Die PCR-Bedingungen sind in Tab. 5.3–2 angegeben.

1 µl der DNA wurde als Template in den Ansatz für die PCR eingesetzt. Dieser bestand aus 0,25 µM eines jeden Primers, 0,2 mM dNTPs (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen) und 1 U Taq-Polymerase (Invitrogen) in einem Volumen 20 µl in PCR-Puffer (Invitrogen). Für die PCR wurde ein Mastercycler der Fa. Eppendorf ver-

Tab. 5.3–2 Bedingungen für die PCR

	T [°C]	t [sec]
Denaturierung	94	120
1 Denaturierung	94	30
2 Annealing	^a	30
3 Extension	72	90
Final extension	72	420
Anzahl der Zyklen (1–3):	33	

^a s. Tab. 5.3–1

wendet. Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen (1,5%) elektrophoretisch getrennt (s. S. 107).

Ergebnisse

In Abb. 5.3–1 sind die PCR-Produkte der einzelnen Primerkombinationen nach gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt. Jede der Primerkombinationen führte in der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von mindestens einer Bande. Die Kontrolle, bei der kein DNA-Template in den PCR-Ansatz eingesetzt worden war, war stets negativ. Bei den Primerkombinationen für Hyp 1 und Hyp 22 war stets nur eine Bande sichtbar, bei Hyp 16 und Hyp 23 zwei bzw. eine Vielzahl von Banden. Die Zahl der amplifizierten Banden war innerhalb einer Primerkombination unabhängig von der als Template eingesetzten DNA stets gleich.

Die Länge der erhaltenen Banden bei Hyp 1 und Hyp 22 entsprach jeweils der Länge, die aufgrund der vorliegenden Sequenzen erwartet worden war.

Diskussion

Die Primer für Hyp 16 und Hyp 23 vervielfältigten in der PCR mehrere Banden pro Ansatz. Dies kann mit der Struktur der Primer erklärt werden. In beiden Fällen weisen sie nämlich repetitive Sequenzen auf (s. Tab. 5.3–1). Diese kommen im Genom häufig vor (GOTTSCHALK 1994). Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Amplifikate im PCR-Produkt auftreten, hoch. Zudem war die Annealingtemperatur bei der PCR mit den Hyp 23-Primern, in deren Amplifikaten die meisten Banden nachweisbar waren, mit 45°C sehr

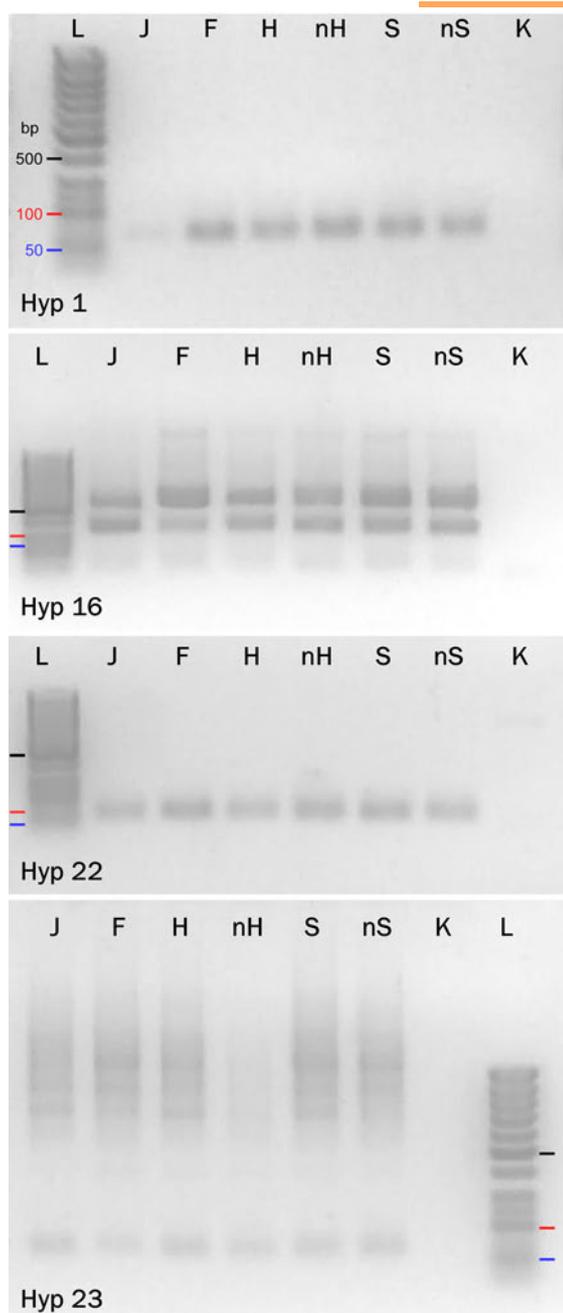


Abb. 5.3–1 PCR-Produkte verschiedener Primerkombinationen (für die Amplifikation von Hyp 1, 16, 22, 23) nach gelelektrophoretischer Trennung. L: DNA-Ladder (angegeben sind 500, 100 und 50 bp); J: Jojo; F: Felsina; H, nH, S, nS: bulks; K: Kontrolle (ohne DNA-Template).

niedrig, was unspezifische Bindungen begünstigte. Wurden aber höhere Temperaturen zur Primeranlagerung gewählt, konnte kein Amplifikat mehr detektiert werden.

Tab. 5.3–3 Primerbindungsstellen (farbig markiert) bei den AFLP-Fragmenten Hyp 1, 22 und 16

Sequenz (5'→3')	
Hyp 1	CCGAGATGATCGGTTTCCCACCTCATCG GTTTGGCGTACGGTTTGGATTTTCTCCA AACCGAAGTTCACGGTTCGGCGCGCGGT TTGACCTAATAACCGAACCAACCAAAC CGGGCCCCACCCCTAATCCAAACTGTCTA TGTTTTAGATAATCGTTCAAATATCATC TCTATAAAAAAAAAATCACTTG
Hyp 22	CAACTAAATGTTGACTTCTAAATATTTT TGACCAACTAGGTGAATTATTCCAAATA AAAAATTGATGGGCCAAACGGATTTGGG AACAAATTCGTCCTTCTTGGTGTGAGCA TCTTTGCATGGCGTGCTAGCTTTTCGAGG CTG
Hyp 16	TTAACATGAGAGAGAGAGAGAGAAGGCT TGGGTTTCCATGAGGAACAGAGGCTTT GAGAGATGAAGCTTGCTCTCCAGATATG TGTTGTGAAAGAGAGGTAGAAGATGAA AGCATGGGTGGCTTTAGCATATTTCCAG CAGCTTGACGAAAGCTTCGTCAAGCTTC TGGACGATTTGACAGAAGAGAAAATGGG AAGCAATGGAAGAACAAGTCTTGAAATT GAAGGGTTCCAAGATGAGAGATGATACT TGCTCTCTCTGGATGTGGGTTTTGAAAG AGAGAAAAGAGGAAGATGGAAGAACAAA GCATGAAATTGAAGGGGCCAAAGGGGAT GCTTGCCTTCGATGAATTC

Polymorphismen im Bandenmuster beruhen bei der AFLP-Methode darauf, dass in verschiedenen Genotypen unterschiedliche Allele eines oder mehrerer Gene vorliegen, die sich in der Anzahl und/oder Lage von Restriktionsschnittstellen unterscheiden. Die Primer, die für die Amplifikation der sequenzierten AFLP-Fragmente synthetisiert wurden, waren nicht in jedem Fall komplementär zu Sequenzen an den äußersten Enden des jeweiligen Fragments, sondern banden in Bereichen mit einigen Basenpaaren Abstand vom Rand. Im vorliegenden Fall war dies bei den Primern für Hyp 1, Hyp 16 und Hyp 23 der Fall (s. Tab. 5.3–3). Um ein für die Amplifikation in der PCR optimales Primerpaar zu erstellen, muss nämlich die Annealingtemperatur der beiden einzelnen Primer aufeinander abgestimmt werden. Dies ist nicht möglich, wenn nur die äußersten Randbereiche eines Fragments in

die Überlegungen zur Erstellung der Primerbasenfolge einbezogen werden. So ist zu erklären, dass unabhängig von der eingesetzten Template-DNA in allen Varianten ein Amplifikationsprodukt auftrat.

Mit der gleichen Zielsetzung entwickelten BRUGMANS et al. (2003) aus AFLP-Fragmenten bei diploiden Kartoffeln *Single-Locus*-Marker. Sie berichten in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen, dass mit den verwendeten Primern in allen Genotypen Genomabschnitte amplifiziert wurden, auch in denjenigen, in denen das betreffende Fragment bei der AFLP-Analyse fehlte.

Die Unterschiede im Genom verschiedener Genotypen beschränken sich in der Regel aber nicht auf verschiedene Restriktionsschnittstellen für die in der AFLP-Analyse verwendeten Enzyme. In Fragmenten, die bei der AFLP-Methode Polymorphismen bedingen, liegen in der Regel weitere Einzelnukleotidaustausche oder Deletionen bzw. Insertionen vor, die als Marker ebenso genutzt werden können. BRUGMANS et al. (2003) schlagen hierfür folgende Wege vor:

- Verdau der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen und gelelektrophoretische Trennung (Entwicklung von CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*)-Markern),
- Trennung der Amplifikate in einem Verfahren, das nicht nur die Länge, sondern auch die Basenabfolge der Fragmente berücksichtigt,
- Klonierung und Sequenzierung der Fragmente im PCR-Produkt.

Nachfolgend sollen die genannten Verfahren auf die beiden AFLP-Marker Hyp 1 und Hyp 22 angewandt werden. Bei ihnen wurde mit den synthetisierten Primern jeweils spezifisch eine DNA-Bande amplifiziert.

5.3.2 Eignung der Fragmente als CAPS-Marker

Können die PCR-Produkte ein und desselben Primerpaars mit Restriktionsendonucleasen in verschiedene Fragmente gespalten werden und kann diese Eigenschaft der unterschiedlichen Spaltbarkeit mit einer Eigenschaft der Pflanze korreliert werden, so spricht man von CAPS-Markern (KONIECZNY und AUSUBEL 1993). Sie sind einfach zu handhaben, da lediglich eine PCR und ein nachfolgender enzymatischer Verdau notwendig sind, um auf Agarosegelen Polymorphismen im Bandenmuster zwischen verschiedenen Genotypen nachzuweisen. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob die vorliegenden PCR-Produkte mit Endonucleasen so gespalten werden können, dass sich Polymorphismen zwischen hypersensiblen und anfälligen Genotypen ergeben.

Material und Methoden

Die PCR-Produkte, die auf DNA der Sorten 'Jojo' und 'Felsina' zurückgingen, wurden mit dem MSB Spin PCRapace Kit (Invitek) nach Herstellerangaben gereinigt. 5 µl des gereinigten PCR-Produkts wurden mit 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (Fermentas), 2 µl des entsprechenden Puffers (Fermentas) und 12 µl H₂O bei 37°C für drei Stunden unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Folgende Enzyme wurden verwendet:

- 1 PauI (Schnittstelle: 5'-G↓CGCGC-3') und MboI (Schnittstelle: 5'-↓GATC-3') (als Gemisch, jeweils 1 µl Enzym, daher nur 11 µl H₂O)
(Puffer (10×): 10 mM Tris-HCl (pH 8,5 bei 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA) (Aktivität: 0,2 bzw. 0,3 U/µl),
- 2 HpaII (Schnittstelle: 5'-C↓CGG-3')
(Puffer (10×): 33 mM Tris-Acetat (pH 7,9 bei 37°C), 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kalimacetat, 0,1 mg/ml BSA) (Aktivität: 1 U/µl)
- 3 AluI (Schnittstelle: 5'-AG↓CT-3')
(im gleichen Puffer wie (2)) (Aktivität: 0,6 U/µl).

Nach dem Verdau mit den Restriktionsendonucleasen wurden die Fragmente in Agarosegelen (2,5%) elektrophoretisch getrennt (s. S. 107).

Ergebnisse und Diskussion

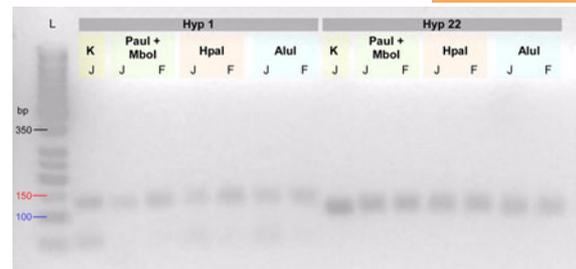


Abb. 5.3–2 Restriktionsverdau der PCR-Produkte (Hyp 1 und Hyp 22) mit verschiedenen Enzymen. L: 50bp-DNA-Ladder (angegeben sind 350, 150 und 100 bp), K: Kontrolle (DNA von 'Jojo', unverdaut), J: Jojo, F: Felsina.

Abb. 5.3–2 zeigt die Ergebnisse des Restriktionsverdau. Ersichtlich ist, dass mit den verwendeten Enzymen in keiner Variante eine Spaltung des Fragments erfolgte. Dies bedeutet, dass sich die Fragmente Hyp 1 und Hyp 22 mit den verwendeten Enzymen nicht als CAPS-Marker verwenden lassen. Die Amplifikate unterscheiden sich nicht in Sequenzen, die die Enzyme als Schnittstellen erkennen.

Für die Entwicklung von CAPS sind die Fragmente mit einer Länge von unter 150bp zu kurz. Bei längeren Fragmenten wäre die Wahrscheinlichkeit, dass Restriktionsschnittstellen in unterschiedlichen Allelen auftreten, bedeutend höher. KONIECZNY und AUSUBEL (1993) beispielsweise gingen bei der Umwandlung von RFLP- in CAPS-Marker bei *Arabidopsis* von Fragmenten aus, die zwischen 1000 und 1700bp lang waren.

5.3.3 Single Nucleotide Polymorphism

Die relativ einfache und ressourcenextensive Methode, durch die Existenz oder das Fehlen von Restriktionsschnittstellen bedingte Unterschiede zwischen Allelen im PCR-Amplifikat-

Gemisch als CAPS-Marker zu nutzen, war im vorliegenden Fall nicht möglich. Daher wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Sequenz der Allele gibt, die zu Konformationsänderungen der einzelsträngigen DNA bei der Wanderung durch nicht-denaturierende Gele führen. Hierzu wurde die SSCP (*single strand conformation polymorphism*)-Methode (ORITA et al. 1989) angewandt. Sie eignet sich insbesondere für die Trennung von Fragmenten, die weniger als 200 Basenpaare lang sind.

Material und Methoden (I)

Mit den Primern für die Amplifikation der Fragmente Hyp 1 und Hyp 22 (s. Tab. 5.3–1 auf S. 113) wurde eine PCR mit der DNA der Sorten 'Jojo' und 'Felsina' durchgeführt (s. Kapitel 5.3.1 „Design von Primern für einzelne AFLP-Fragmente“ auf S. 113). Die PCR-Produkte wurden mit dem MSB Spin PCRapace Kit (Invitex) nach Herstellerangaben gereinigt.

Die DNA wurde im Labor der Fa. Elchrom Scientific (Cham, Schweiz) von dortigen Mitarbeitern nach Hitzedenaturierung auf Spreadex EL 300 Wide Mini-Gelen bei einer Spannung von 120V (10V/cm) und einer Temperatur von 55°C für 3 Stunden in 0,03M TAE-Puffer getrennt. Hierzu wurde eine Elektrophoresekammer des Typs SEA 2000 (Elchrom) verwendet. Die DNA wurde mit SYBR Gold (Invitrogen Molecular Probes) gefärbt.

Ergebnisse und Diskussion (I)

In Abb. 5.3–3 ist das gefärbte Gel abgebildet. Im Fall der Amplifikate mit den Hyp 1-Primern ergab sich bei beiden Sorten eine starke Bande mit gleicher Laufweite. Hingegen zeigten sich beim PCR-Produkt, das mit den Primern für Hyp 22 amplifiziert wurde, polymorphe Banden: Die PCR-Produkte beider Sorten waren demnach Gemische mehrerer Amplifikate, die sich entweder durch geringfügige Unterschiede in der Länge und/oder in der Konformation unterschieden. Konformationsunterschiede sind auf Abweichungen in der Basenabfolge zurückzuführen. Die Bandenmuster der beiden Sorten stimmen nicht überein, es gibt lediglich eine Bande, die im elektrischen Feld gleich weit wandert. Diese ist

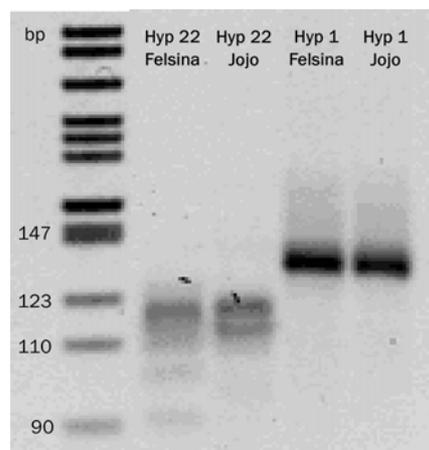


Abb. 5.3–3 Trennung der PCR-Produkte Hyp 22 und Hyp 1 mittels der SSCP-Methode. (linke Spur: Marker M1 (Elchrom))

relativ stark. Dies könnte damit erklärt werden, dass es ein Allel gibt, das in beiden Eltern gleichermaßen und zudem in mehreren Kopien vorliegt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte Hyp 22, die auf die DNA der Sorten 'Jojo' und 'Felsina' zurückgingen, kloniert und die Inserts sequenziert.

Material und Methoden (II)

Die Fragmente im PCR-Produkt, das mit den Hyp 22-Primern gewonnen worden war, wurden in den Vektor pBluescript II KS mit Poly-T-Überhängen kloniert. Dazu wurden je 5 µl des gereinigten PCR-Produkts mit 2 µl Vektor (1 µg/µl), 1 µl Ligationpuffer (MBI), 1 µl T4-DNA-Ligase (5U/µl, MBI) und 1 µl H₂O über Nacht bei 4°C inkubiert. 100 µl kompetente Bakterienzellen (*Escherichia coli*) des Stamms DH5α (Invitrogen) wurden mit 5 µl des Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 45 Sekunden durch Eintauchen ins Wasserbad einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt und danach sofort für zwei Minuten auf Eis gestellt. Nachfolgend wurden 900 µl SOC-Medium (s. S. 110) zugegeben, und die Bakterien-suspension wurde 60 Minuten bei 37°C und 250U/min geschüttelt. 100 µl der Suspension wurden in einer Petrischale auf LB-Medium mit Ampicillin (1 µl/ml), X-Gal (40 µg/ml) und IPTG (10 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C

Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
F1	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F2	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F3	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F4	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F5	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F6	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F7	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F8	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F9	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F10	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F11	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
F12	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J1	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J2	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J3	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J4	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J5	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J6	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J7	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J8	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J9	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							
J10	CGAAAGCTAGCAGCCATGCAA	AGATGCTCACACCAAGAAGGACGAATTTGTTCCCAAAT	CCGTTTGGCCCATCAATTATTTT	ATTGGAATAATT	CACCTAGTTGGTCAAAA							

Abb. 5.3–4 Vergleich der Sequenzen der Allele der Sorten ‘Felsina’ (F) und ‘Jojo’ (J). Die Ziffern hinter den Buchstaben stehen für den Bakterienklon, aus dem das Plasmid mit dem Allel als Insert isoliert wurde. In der obersten Zeile ist die Länge des Fragments in Basenpaaren angegeben. Unterschiede zwischen den Sequenzen sind farblich hervorgehoben.

aufgestellt. Nach 20 Stunden wurden von beiden Varianten je 12 weiße Kolonien aufgenommen und damit 5 ml LB-Medium (mit 1 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Nach weiteren 15 Stunden wurden aus den insgesamt 24 Suspensionen mit je einem Bakterienklon Plasmide präpariert. Hierzu wurde der Perfectprep Plasmid Mini-Kit (Eppendorf) nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmide wurden in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

5 µl davon wurden mit 0,5 µl HindIII, und 0,5 µl EcoRI in Puffer (3,3 mM Tris-Acetat (pH 7,9 bei 37°C), 1 mM Magnesiumacetat, 6,6 mM Kaliumacetat, 0,01 mg/ml BSA) verdaut und gelelektrophoretisch getrennt. Waren die Bakterien transformiert, so war das Insert mit einer entsprechenden Länge von ca. 110 Basenpaaren als Bande sichtbar. Bei den Bakterienklonen, die auf das PCR-Produkt von ‘Felsina’ zurückgingen, wiesen alle das 110bp-Insert auf, bei den auf das PCR-Produkt von ‘Jojo’ zurückgehenden zehn. Die entsprechenden Plasmide wurden sequenziert (Fa. AGOWA, Berlin).

Ergebnisse (II)

Abb. 5.3–4 zeigt die Sequenzen der Plasmidinserts der einzelnen Bakterienklone. Jede Se-

quenz stellt eine mögliche Ausprägungsform des Genomabschnitts dar, der mit den Primern für Hyp 22 amplifiziert wurde.

Insgesamt wurden sieben verschiedene Allelabschnitte nachgewiesen. Die Unterschiede betrafen ausschließlich Austausch oder Deletionen eines einzelnen Nucleotids. Pro Sequenz konnte bei den 112 bis 113bp langen Fragmenten stets nur eine Änderung bezüglich der am häufigsten vorkommenden Sequenz beobachtet werden. Diese kam in beiden Genotyphen vor (Sequenz F10–12 und J1–6 in Abb. 5.3–1). Bei ‘Jojo’ wurde sie in sechs, bei ‘Felsina’ in drei der 10 bzw. 12 untersuchten Bakterienklone aufgefunden.

Bei jeder der beiden Sorten wurden neben der gemeinsamen Sequenz je drei zusätzliche, unterschiedliche Allele nachgewiesen. Bezogen auf die Sequenz, die den Sorten gemeinsam war, waren bei ‘Felsina’ Einzelnucleotidaustausche auf die Positionen 60, 61 und 67 beschränkt. Bei ‘Jojo’ traten Nucleotidaustausche an den Positionen 23 und 85 sowie eine Deletion an Position 84 auf. Sämtliche beobachteten Unterschiede konnten nach Überprüfung der Chromatogramme der Sequenzierreaktionen als gesichert eingestuft werden.

Diskussion (II)

Die Ergebnisse der Auftrennung der PCR-Fragmente mittels der SSCP-Methode wurden mit der Sequenzierung bestätigt: Es bestehen Unterschiede in der Sequenz der PCR-Amplifikate. Dabei handelt es sich um *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Damit bestätigt sich für die Europäische Pflaume die von BRUGMANS et al. (2003) für die Kartoffel getroffene Feststellung, dass es für ein AFLP-Fragment verschiedene allele Formen zwischen den untersuchten Genotypen gibt, die sich nur in geringfügigen Änderungen der Basenabfolge zeigen. Dies eröffnet auch für *Prunus domestica* den Weg, AFLP-Marker in einfach zu handhabende PCR-Marker zu überführen.

Pro Sorte wurden vier verschiedene Fragmente isoliert. Im hexaploiden Genom der Europäischen Pflaume sind maximal sechs Ausprägungsformen denkbar, wobei ein und dasselbe Fragment auch in mehrfacher Kopie vorkommen kann. Zumindest für eine Ausprägungsform des Allels gibt es eine Übereinstimmung in beiden Genotypen. Es ist also nicht davon auszugehen, dass diese Form als Marker für die Hypersensibilität herangezogen werden kann. Da aber insgesamt sieben verschiedene Allele nachgewiesen werden konnten, unterscheiden sich 'Jojo' und 'Felsina' mindestens in einem davon, nach den vorliegenden Ergebnissen in dreien. Um hierüber eine endgültige Entscheidung zu treffen, müssten die Plasmidinserts weiterer Bakterienklone sequenziert werden. Für die Aussage, dass die gezeigten SNPs als mögliche Marker für die Hypersensibilität fungieren können, ist dies aber unerheblich.

5.3.4 Ausblick auf die weitere Vorgehensweise

Es konnte nachgewiesen werden, dass für polymorphe AFLP-Fragmente erzeugte Primer im Genom der Europäischen Pflaume Sequenzen amplifizieren können, die sich durch Punktmutationen in Form von Nucleotidaustauschen oder Deletionen unterscheiden. Diese können als Grundlage für die Entwicklung von CAPS- oder dCAPS-Markern (NEFF et al. 1998) dienen. Hier-

zu sind in weiteren Untersuchungen folgende Schritte zu unternehmen:

Zunächst ist zu versuchen, ob die Unterschiede zwischen den verschiedenen Allelen Änderungen im Auftreten von Restriktionsschnittstellen bedingen. Ist dies der Fall, so liegen putative CAPS-Marker vor. Das Auffinden von Schnittstellen für Restriktionseendonucleasen wird von verschiedenen Computerprogrammen, z. B. Vector NTI Advance™ (Invitrogen), unterstützt.

Lassen sich keine Restriktionsschnittstellen für die Unterscheidung der Fragmente nutzen oder sind dafür sehr teure Enzyme notwendig, so können andere Verfahren in Betracht gezogen werden, die in den zurückliegenden Jahren für die Entwicklung von SNP-basierten Markern beschrieben und erfolgreich angewandt wurden (BRADEEN und SIMON 1998, SHAN et al. 1999, NEGI et al. 2000, MEKSEM et al. 2001). Zwei grundsätzliche methodische Ansätze sollen kurz angeführt werden:

- NEFF et al. (1998) beschreiben eine Modifikation der CAPS-Methode, die *derived cleaved amplified polymorphic sequence* (dCAPS) *analysis*. Hierbei wird durch Verwendung sog. *mismatched primer* eine Restriktionsschnittstelle, die die Sequenz des SNP beinhaltet, in das PCR-Produkt eingeführt, welches nachfolgend durch Verdau mit dem geeigneten Restriktionsenzym in Fragmente zerschnitten und im Agarosegel aufgetrennt wird. Nur in dem Fall, dass die Template-DNA, die in den PCR-Ansatz eingesetzt wird, den SNP beinhaltet, für den der Primer konstruiert wurde, wird das Amplifikationsprodukt die betreffende Restriktionsschnittstelle aufweisen. NEFF et al. (2002) beschreiben ein für die Entwicklung von dCAPS geeignetes Computerprogramm „dCAPS Finder 2.0“. Für das Allel, das in beiden Elternsorten 'Jojo' und 'Felsina' nachgewiesen wurde, und das Allel J10, das nur in 'Jojo' auftrat, wurden mit diesem Programm mögliche Primersequenzen zur Entwicklung von

Die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV

Number of mismatches in the primer: 1

Wild Type Forward: CCGTTTGGCCCATCAATTATTTTATTGGGAATAATTCAC
 Mutant Forward: CCGTTTGGCCCATCAATTATTTTA^CTTGGGAATAATTCAC
 Wild Type Reverse: GTGAATTATTCCAATAATAATAATTGATGGGCCAAACGGG
 Mutant Reverse: GTGAATTATTCCAAG^GTAAAATAATTGATGGGCCAAACGGG

These matches were found for:

Cutting wild type forward sequence :

ENZYME	RECOGNITION SEQUENCE	PRIMER SEQUENCE
TspEI :	AATT	CCCGTTTGGCCCATCAATTATTT ^A A

Cutting wild type reverse sequence :

ENZYME	RECOGNITION SEQUENCE	PRIMER SEQUENCE
Hpy178III :	TCNNGA	GTGAATTATTCCA ^G
HinfIII :	CGAAT	GTGAATTATTCC ^G A

Cutting mutant forward sequence :

ENZYME	RECOGNITION SEQUENCE	PRIMER SEQUENCE
MaeIII :	GTNAC	CCCGTTTGGCCCATCAATTAT ^G TTA
MjaIIV :	GTNNAC	CCCGTTTGGCCCATCAATTA ^G TTTA
RsaI :	GTAC	CCCGTTTGGCCCATCAATTATT ^G TA
SecI :	CCNNGG	CCCGTTTGGCCCATCAATTATTT ^C
StyI :	CCWWGG	CCCGTTTGGCCCATCAATTATTT ^C
TatI :	WGTACW	CCCGTTTGGCCCATCAATTATT ^G TA

Cutting mutant reverse sequence :

ENZYME	RECOGNITION SEQUENCE	PRIMER SEQUENCE
BsaAI :	YACGTR	GTGAATTATTCCA ^C
DdeI :	CTNAG	GTGAATTATTCT ^T AA
EcoRII :	CCWGG	GTGAATTATTCCA ^G
MaeI :	CTAG	GTGAATTATTCC ^T A
MaeII :	ACGT	GTGAATTATTCCA ^C
NlaIII :	CATG	GTGAATTATTCCA ^T
SerFI :	CCNNG	GTGAATTATTCCA ^G

Abb. 5.3–5 Generierung von Primersequenzen für die dCAPS-Analyse am Beispiel der Sequenzen F12 (wild type) und J10 (mutant) mit dem Programm dCAPS Finder 2.0 (NEFF et al. 2002). Dargestellt ist ein Output des Programms.

dCAPS-Markern erstellt. Sie sind in Abb. 5.3–5 dargestellt. Verwendbare Primer und Restriktionsenzyme können der Darstellung entnommen werden.

- DRENKARD et al. (2000) benutzen ebenfalls *mismatched primer*, die an die Stelle des SNP binden. Allerdings wird dabei keine Restriktionsschnittstelle in das PCR-Amplifikat eingeführt wie bei der dCAPS-Methode. Mit dem Verfahren soll die Spezifität der Amplifizierung ausschließlich des gewünschten Allels mit der SNP-Sequenz erhöht werden. Das Verfahren wird als *single-nucleotide amplified polymorphism* (SNAP) bezeichnet. Für die Generierung der Primer steht auch hierfür ein computergestütztes Programm zur Verfügung (SNAPER). Das Verfahren bietet den Vorteil, dass nach der PCR kein Restriktionsverdau notwendig ist.

Ist es gelungen, unterschiedliche Allele in den einzelnen Genotypen nachzuweisen, so müssen abschließend die gesamte Nachkommenschaft, die aus der Kreuzung 'Jojo' × 'Felsina' entstand, sowie die Nachkommen wenigsten einer weiteren Kreuzungskombination, die hinsichtlich des Merkmals Hypersensibilität spalten, auf das Vorliegen der entsprechenden Fragmente überprüft werden. Erst dann ist eine abschließende Bewertung über die Eignung der entwickelten Marker für die Selektion hypersensibler Genotypen möglich.

5.4 Zusammenfassung und Bewertung

Basierend auf den Nachkommen der Kreuzungskombination 'Jojo'×'Felsina' wurden mittels *bulk segregant analysis* putative AFLP-Marker für das Merkmal Hypersensibilität gegenüber PPV entwickelt. Um diese in DNA-Marker zu überführen, die in der Handhabung einfacher und somit für die Untersuchung ganzer Kreuzungsnachkommenschaften besser geeignet sind, wurde eine Strategie angewandt, die von der Sequenzierung polymorpher AFLP-Fragmente ausgeht und über die einfache Amplifikation mittels Primern, die an Sequenzen der AFLP-Fragmenten binden, bis hin zum Nachweis führte, dass multiple allele Sequenzen vorliegen, die sich durch SNPs voneinander unterscheiden. Diese können nun in relativ einfachen Schritten zur Entwicklung von PCR-basierten DNA-Markern genutzt werden.

Das vorgestellte System zum Auffinden von DNA-Markern für die Hypersensibilität gegenüber PPV ist zielführend und lässt bei Einsatz eines ausreichenden Aufwandes an ökonomischen Ressourcen nutzbare Ergebnisse erwarten.

Der Nutzen des Aufwandes dieser Ressourcen muss gegenüber anderen Möglichkeiten der Detektion hypersensibler Genotypen abgewogen werden: Jede Pflanze, in der ein Marker genachgewiesen wurde, muss einem Test unterzogen werden, mit dem die Kopplung des Markergens mit der gewünschten Eigenschaft überprüft wird. Im vorliegenden Fall bedeutet dies, dass die Hypersensibilität mittels eines Tests durch Doppelpfropfung mit PPV-infizierter Zwischenveredlung überprüft werden muss.

Der Einsatz markergestützter Selektion ist dann sinnvoll, wenn das herkömmliche Testverfahren einen hohen Aufwand erfordert und/oder der Anteil der Nachkommen mit der gewünschten Eigenschaft sehr niedrig ist, so dass viele Individuen getestet werden müssen, bis eine gewisse Anzahl hypersensibler detektiert wird.

Beide Bedingungen sind im vorliegenden Fall nicht gegeben:

- 1 Samen der Europäischen Pflaume können unmittelbar nach der Ernte ausgesät werden. Dazu werden die Steine geknackt und die Integumente sowie die Nucellus- und Endospermreste vom Embryo abgezogen (THEILER 1971). Bei einer Kultur im beheizten Gewächshaus und unter Einsatz von Zusatzbelichtung können, zumindest bei Muttersorten, die vor September reifen, bis Dezember 1,5 bis 2 m hohe Sämlinge herangezogen werden. Von diesen können ab Ende November Augen entnommen und durch *chip budding* auf antreibende, PPV-infizierte Pflanzen veredelt werden. Die Reaktion der austreibenden Augen gibt Aufschluss über den Hypersensibilitätsgrad der Sämlinge. Alternativ kann im der Aussaat folgenden Frühjahr ein Test durch Doppelpfropfung vorgenommen werden. So lässt sich innerhalb eines Jahres nach der Bestäubung die Entscheidung über die HK eines beliebigen Genotyps treffen. Eine schnellere Beurteilung ist nicht notwendig, da die Sämlinge vor dem Auspflanzen im Freiland selektiert werden können. Die Ausprägung der Hypersensibilität ist im vorgestellten Testsystem überdies nur in geringem Maß umweltabhängig, so dass auch aus dieser Sicht der Einsatz von DNA-Markern keinen Vorteil bringt.
- 2 Der Anteil hypersensibler Nachkommen liegt bei der Auswahl geeigneter Kreuzungskombinationen bei deutlich über 25% (s. Kapitel 4 „Vererbung der Hypersensibilität gegenüber PPV“ auf S. 89). Zudem liegt die Gesamtzahl der Nachkommen pro Kreuzungskombination bei 50 bis 100 Individuen und ist damit niedrig.

Unter diesen Gesichtspunkten nimmt die Entwicklung molekularer Marker für die Hyper-

sensibilität der Europäischen Pflaume mit dem Ziel, den Selektionsprozess in der Züchtung zu beschleunigen, zum derzeitigen Stand des Wissens keine Schlüsselstellung ein. Erst in einem Stadium, in dem die Pyramidisierung verschiedener Resistenzquellen (MELCHINGER 1990) möglich ist und sämtliche Resistenzquellen durch DNA-Marker nachweisbar sein müssen, wird ihre Bedeutung steigen, weil dann eine phänotypische Erkennung der HR potentiell nicht mehr in einem einfachen Testsystem möglich ist.

Einen bedeutenden Fortschritt würde es jedoch darstellen, an der Resistenz beteiligte Gene zu identifizieren. Dies ist ein wichtiger Schlüssel zum Verständnis des Mechanismus der HR der Europäischen Pflaume gegenüber PPV. Hierfür müsste allerdings ein anderer methodischer Ansatz verfolgt werden. DONDINI et al. (2004) klonierten beispielsweise *resistance gene analogues* (RGAs) aus der Aprikose. Dabei nutz-

ten sie zum Primerdesign stark konservierte Regionen von bekannten Sequenzen von Resistenzgenen, die aus krautigen Pflanzen isoliert worden waren. Mit wenigen Primerkombinationen konnten sie Gene amplifizieren, die sie acht verschiedenen Resistenzengruppen zuordnen konnten. Eine der amplifizierten Sequenzen trat nur im Genom scharkaresistenter Genotypen auf. (Die Autoren schlagen diese Sequenz auch als Marker für die quantitative Scharkaresistenz der Aprikose vor.) Ein derartiger methodischer Ansatz würde es im besten Fall ermöglichen, Gene zu sequenzieren, die an der Ausprägung der Hypersensibilitätsresistenz unmittelbar beteiligt sind. Dadurch würde es ermöglicht, den Resistenzmechanismus eingehend zu untersuchen, z. B. durch das Blockieren der Translation des Gens oder der Transkription der entsprechenden mRNA oder den Transfer des Gens in krautige Wirtspflanzen des Scharkavirus.

6 Zukünftige Nutzung der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharkavirus hinsichtlich ihrer Ausprägungsformen bei verschiedenen Genotypen von *Prunus domestica* und hinsichtlich ihrer Vererbbarkeit dargestellt. Die virusbedingte hypersensible Reaktion wurde mit histologisch-histochemischen und stoffwechsellanalytischen Methoden beschrieben, und ihre Auswirkungen auf die Hemmung der Virusausbreitung in der Pflanze wurden gezeigt. Nachfolgend soll nun dargelegt werden, welche Bedeutung die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume für ihren Anbau hat und wie das Potential der Hypersensibilitätsresistenz genutzt werden kann. Daraus kann abgeleitet werden, welcher Stellenwert ihr in künftigen Forschungs- und Züchtungsprogrammen einzuräumen ist.

Dieser Betrachtung vorangestellt sei folgende Bemerkung zu den Absterbeerscheinungen hypersensibler Genotypen nach PPV-Infektion: Diese treten bei hypersensiblen Genotypen, die zur Viruslokalisierung befähigt sind, nur nach künstlicher Inokulation durch Veredlung auf. Bei natürlicher Inokulation durch Blattläuse zeigen die Bäume keinerlei Symptome und erkranken nicht. Sie können nicht als Infektionsquelle für PPV dienen. Ihnen kann eine vollständige Feldresistenz zugesprochen werden.

Bedeutung für die Verhinderung der Virusausbreitung. Die Scharkavirose verursacht im Anbau der Europäischen Pflaume hohe finanzielle

Verluste. Sie ist aufgrund ihrer wirtschaftlichen Bedeutung und ihres schnellen Ausbreitungspotentials als Quarantäneschaderegger eingestuft. Die Züchtung resistenter Sorten ist die einzig wirksame Methode, wirtschaftlichen Schaden, der durch PPV verursacht wird, einzudämmen (s. Kapitel 1). Die Ausbreitung des Virus wird durch die Verwendung quantitativ resistenter Sorten nicht verhindert, sondern vielmehr begünstigt, da Infektionen bei quantitativ resistenten Genotypen, die nur schwache Blattsymptome ausprägen, sowohl in der Baumschule als auch in der Anlage oft unerkannt bleiben. Aus diesem Grund blieben alle bisher ergriffenen Quarantänemaßnahmen, die die Ausbreitung des Virus in bislang befallsfreie Gebiete verhindern sollten, langfristig erfolglos. Dies belegen Berichte über das Auftreten der Scharkavirose in immer neuen Gebieten und Ländern wie jüngst in der Schweiz (HÖHN et al. 2005) und China (NAVRATIL und SAFAROVA 2005). Auch die Verwendung der (bislang einzig verfügbaren) gentechnisch modifizierten Pflaumenhybride 'C5', bei der das PPV-Hüllprotein ins Genom integriert wurde, verhindert nicht die großräumige Virusausbreitung, da Bäume dieser Sorte nachweislich über infizierte Unterlagen und über Veredlung mit dem Virus infiziert werden können (MALINOWSKI et al. 1998 und 2004, s. auch Abb. 1.4–3 auf S. 30).

Nach aktuellem Stand des Wissens ist es nur durch den Anbau hypersensibler Sorten möglich, die Ausbreitung des Scharkavirus durch Pflanzmaterial zu verhindern. Bäume dieser Sor-

ten sind nämlich *per se* frei von Scharkaviren. Werden Reiser hypersensibler Genotypen in der Baumschule auf latent infizierte Unterlagen veredelt, stirbt der Austrieb des hypersensiblen Veredlungspartners nach wenigen Wochen ab. Dadurch wird nicht nur verhindert, dass PPV-befallene Pflanzen in Verkehr gelangen, sondern es können auch keine Infektionsherde in der Baumschule entstehen. Hypersensible Genotypen der Europäischen Pflaume sind demnach bestgeeignet, um die Ausbreitung des Scharkavirus über Pflanzmaterial zu unterbinden.

Umgekehrt können Edelreiser durch Veredlung auf Bäume hypersensibler Sorten auf PPV-Befall getestet werden. Virusinfizierte Edelreiser werden abgestoßen, und der Austrieb des PPV-infizierten Edelreises stirbt ab. Dies könnte ein einfaches Testsystem auf Scharkafreiheit von Vermehrungsmaterial insbesondere für Länder sein, in denen kein wirksames Zertifizierungssystem für die Vermehrung von Obstgehölzen existiert und molekularbiologische Nachsverfahren für das Scharkavirus zu teuer oder nicht etabliert sind. Es müsste darüber hinaus geprüft werden, ob beim Aufbau von Reiserschnittgärten hypersensible Sorten als Stammbildner verwendet werden können, die die PPV-Freiheit der aufveredelten empfindlichen Sorten garantieren.

Natürlich können auch Reiser hypersensibler Sorten auf Bäume veredelt werden, die auf PPV-Befall getestet werden sollen. Ist der Baum befallen, stirbt der Austrieb des aufgepfropften Edelreises ab. Dazu müssten je nach Größe des zu testenden Baumes mehrere Reiser aufveredelt werden, da das Virus im Baum ungleich verteilt sein kann. Die Entscheidung, ob der getestete Baum mit PPV infiziert ist, kann bei Veredlung im April oder Mai bis spätestens Juli, also vor Beginn des Reiserschnitts für die Sommerveredlungssaison, gefällt werden.

Hinsichtlich der Nutzung der Hypersensibilität zur Testung auf PPV-Befall sei angemerkt, dass mit dieser Testmethode keine absolute Sicherheit über PPV-Freiheit eines Baumes gewonnen werden kann. Dazu müssten wegen der Ungleichverteilung des Virus in der holzigen Wirtspflanze sämtliche Organteile des zu untersuchenden Baumes durch Veredlung überprüft

werden. Dieses Problem besteht aber bei PCR- oder ELISA-Tests in gleicher Weise: Hier muss eine Stichprobe von Blättern für die Tests entnommen werden; werden zufällig nur solche Blätter gewählt, die virusfrei sind, ist das Testergebnis negativ, auch wenn in anderen Blattspreiten des Baumes Scharkaviren vorhanden sind.

Bedeutung für den Anbau in Scharkabefallsgebieten. Die großräumige Verbreitung des Scharkavirus kann also durch Nutzung hypersensibler Genotypen verhindert werden. Auch die kleinräumige Verbreitung, die über Blattläuse als Vektoren erfolgt, ist bei hypersensiblen Genotypen nicht möglich, da diese PPV-frei sind. Daher ist ihre Verwendung für extreme Scharkabefallslagen die einzig verbleibende Möglichkeit, wirtschaftliche Schäden durch PPV-Befall nicht nur zu minimieren, sondern auszuschließen. Denn auch bei fruchtoleranten Sorten, wie sie bisher in diesen Regionen verwendet wurden, sinkt der Ertrag, wenn sie an Scharka erkranken (NÉMETH 1986, HAMDORF und HEIN 1989).

Züchtung hypersensibler Sorten. Bereits ATANASOFF erkannte in der ersten ausführlichen Abhandlung zur Scharkaproblematik im Jahr 1935, dass die bestmögliche Lösung, die mit der Krankheit einhergehenden Schäden zu umgehen, die Züchtung resistenter Sorten ist. Genau betrachtet zielten die meisten Züchtungsprogramme, die seither angestrengt wurden, aber auf Toleranz (in der Regel Frucht- und Leistungstoleranz) und nicht auf Resistenz ab.

Die Ergebnisse der Züchtung scharkatoleranter Sorten seit dieser Zeit sind beachtenswert; neue Sorten ermöglichten die Aufrechterhaltung des Anbaus unter Scharkabefallsdruck. Dennoch blieb ein zentrales Problem, die Verhinderung der Ausbreitung des Quarantäneschaderregers, ungelöst.

Mit der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV steht der Züchtung eine genetische Ressource zur Verfügung, die einen neuartigen Resistenzmechanismus gegen die Scharkakrankheit einführt. Hypersensible Sorten können unter natürlichen Bedingungen nicht mit PPV infiziert werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass bei der Auswahl ge-

eigneter Kreuzungspartner weit über ein Viertel, in manchen Fällen sogar mehr als die Hälfte der Nachkommen stark hypersensibel reagieren. Die Resistenz durch Hypersensibilität kann demnach effektiv züchterisch genutzt werden.

Entscheidend für die Nutzung einer Resistenzquelle in der Züchtung ist der Aufwand, der zur Bestimmung des Resistenzniveaus der einzelnen Genotypen notwendig ist (WOLFE und GESSLER 1992). Hier weist die Resistenz durch Hypersensibilität einen entscheidenden Vorteil gegenüber der quantitativen Resistenz auf: Bereits innerhalb eines Jahres nach der Bestäubung kann der Hypersensibilitätsindex eines Genotyps ermittelt werden. Bei Züchtung auf quantitative Resistenz ist eine mehrjährige Prüfung mit wiederholter Bestimmung des Virusgehalts in der Pflanze nötig, bei Züchtung auf Fruchttoleranz eine langjährige Prüfung im Ertragsstadium. Hierbei müssen die Pflanzen unter Freilandbedingungen kultiviert und künstlich mit PPV inokuliert werden. Tests auf Hypersensibilität hingegen können im Gewächshaus durchgeführt werden, wo das Arbeiten mit Quarantäneschadern erleichtert ist, und sind innerhalb von fünf Monaten mit aussagekräftigen Ergebnissen abgeschlossen.

Scharkaempfindliche Sorten können erfolgreich als Kreuzungspartner hypersensibler Genotypen in der Züchtung eingesetzt werden, wie die Untersuchungen zur Vererbung der Hypersensibilität zeigen. Damit können qualitativ hochwertige Sorten wie 'Fellenberg', 'Felsina' und 'Hauszwetsche', die PPV-sensibel sind, als Donoren für hohe Fruchtqualität genutzt werden.

Gefahr der Durchbrechung der Hypersensibilitätsresistenz. Derzeit sind bei der Europäischen Pflaume zwei Quellen für die Hypersensibilität gegenüber PPV bekannt: Die virusstammspezifische Hypersensibilität, die von der Hybride 'K4' herrührt (KEGLER et al. 1991), und die nicht stammspezifische der Sorte 'Jojo' und ihres Geschwisterklons 'Ort×Stan34'. Dabei wäre statt der Bezeichnung „stammspezifisch“ die Formulierung „isolatspezifisch“ angebracht, denn zumindest solange die der Resistenz zugrundelie-

genden Pathogenerkennungsprozesse nicht bekannt sind, kann die Spezifität der Auslösung der HR nicht an Einteilungen wie der Virusstammzugehörigkeit festgemacht werden.

Es kann angenommen werden, dass die hypersensible Reaktion, die nach PPV-Infektion abläuft, bei den beiden Resistenzquellen in unterschiedlicher Weise ausgelöst wird. Entweder werden bei 'K4' virale Komponenten als Auslöser für die HR erkannt, die nicht in allen Isolaten in gleicher Beschaffenheit vorhanden sind, oder es sind einige Isolate in der Lage, die von Seiten der Pflanze eingeleitete Abwehrreaktion zu unterbinden.

'Jojo' und 'Ort×Stan34' reagieren gegenüber allen bislang getesteten Isolaten, auch denjenigen, die bei 'K4' die Resistenz überwinden, hypersensibel. Vermutet werden kann, dass als Auslöser für die hypersensible Reaktion eine Struktur fungiert, die in allen oder zumindest sehr vielen Isolaten konserviert vorliegt.

WEBER et al. (2004) untersuchten zwei Resistenzgene aus Tomaten, *Tm-2* und *Tm-2²*, die beide eine HR gegen das *Tomato mosaic virus* (ToMV) bedingen. Sie wiesen nach, dass beide Resistenzgene bzw. ihre Produkte mit unterschiedlichen Domänen des 30kDa-Transportproteins des ToMV interagieren. Das Transportprotein war von WEBER und PFITZNER (1998) als Auslöser für die HR identifiziert worden.

Es können in einer Pflanzenart also unterschiedliche Resistenzgene existieren, die eine Hypersensibilitätsreaktion nach Infektion mit dem gleichen Pathogen auslösen. Je nachdem, ob sie mit stark konservierten oder variablen viralen Nucleinsäure- oder Proteinsequenzen interagieren, ist die Resistenz dauerhaft oder kann von einzelnen Isolaten, die entsprechende Mutationen aufweisen, so dass sie eine Interaktion mit dem pflanzlichen Resistenzgenprodukt umgehen, durchbrochen werden. Dementsprechend ist es möglich, dass bei der Sorte 'Jojo' virale Strukturen, vermutlich Proteine, als relevante Determinanten bei der Pathogenerkennung fungieren, die eine wichtige funktionelle Aufgabe für das Virus erfüllen, so dass Mutationen in diesem Bereich von evolutivem Nachteil für das Virusi-

solat wären. Dafür kämen beispielsweise bestimmte Domänen der viralen Replikase in Frage. Bei der von 'K4' ausgeprägten Hypersensibilität könnten variable Bereiche des Hüllproteins als Auslöser der HR dienen. Zukünftigen Arbeiten wird es vorbehalten sein, diese Mechanismen der Interaktion zwischen PPV und *Prunus domestica* aufzuklären. Dabei könnte der Vergleich der Hypersensibilitätsresistenz von 'Jojo' mit derjenigen von 'K4' eine Schlüsselposition einnehmen.

Die Annahme, dass polygen bedingte Resistenz dauerhafter ist als mono- oder oligogen bedingte, widerlegt VANDERPLANK (1984) an einschlägigen Beispielen. Daher kann nicht pauschal geschlossen werden, dass qualitative Scharkaresistenz, von der angenommen werden kann, dass sie entweder mono- (KEGLER et al. 1993), wahrscheinlich aber oligogen (s. S. 102) kontrolliert wird, weniger dauerhaft ist als polygen bedingte, quantitative. (Überdies steht bislang der Nachweis aus, dass quantitative Scharkaresistenz tatsächlich polygen bedingt ist. Dies wird aber verbreitet angenommen.) Nichtsdestotrotz ist es notwendig, hypersensible Genotypen mit verschiedensten PPV-Isolaten zu testen. Diese Untersuchungen sind insbesondere vor der Zulassung neuer Sorten für jeden hypersensiblen Genotyp unabdingbar. Solange die molekularen Wirkmechanismen der Interaktion zwischen PPV und hypersensiblen Genotyp nicht bekannt sind, ist dies die einzige Möglichkeit, die Stabilität der Virusresistenz im großflächigen Anbau sicherzustellen.

Variabilität des Merkmals Hypersensibilität und daraus resultierende Konsequenzen. Es konnte gezeigt werden, dass es verschiedene Ausprägungsformen der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV gibt. Diese Unterschiede treten am deutlichsten nach Inokulation durch Doppelpfropfung hervor. Die Variabilität zeigt sich in zwei Komponenten:

- 1 in der Befähigung zur Lokalisierung des Virus und
- 2 im Auftreten des programmierten Zelltods nach PPV-Inokulation (Geschwindigkeit und Ausdehnung der von der HR betroffenen Gewebebereiche).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der von KEGLER et al. (2001) getroffenen Einteilung von Nachkommen der hypersensiblen Hybride 'K4'.

Insbesondere das Verhältnis zwischen der Höhe des Inokulums und der Größe der Pflanze hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Ausprägung der Hypersensibilität: Je größer das Inokulum und je kleiner die Pflanze ist, desto stärker wirkt sich die eingeleitete HR auf den Zustand der Pflanze aus. Im Extremfall kann eine hypersensible Pflanze absterben, wenn ausreichend viele PPV-befallene Reiser aufveredelt werden (HARTMANN 2002).

Die Gruppe der schwach hypersensiblen Genotypen, die zu einer Lokalisierung des Virus nicht befähigt sind, ist für die obstbauliche Praxis ungeeignet, für die Erforschung des pflanzlichen Abwehrverhaltens dagegen von großem Interesse.

Bei der Selektion auf Hypersensibilität im Züchtungsprozess sind die nachfolgend aufgeführten Sachverhalte zu berücksichtigen.

- 1 Das Testsystem zur Überprüfung der Hypersensibilität muss standardisiert sein. Am besten eignet sich dazu die Inokulation durch Doppelpfropfung. Als Referenzen sind stets stark hypersensible (wie 'Jojo' und 'Hoh 4517') und sensible (wie 'Cacacs Fruchtbare' und 'Katinka') Sorten mitzuführen.
- 2 Nur Genotypen der HK 3 und mit Einschränkung HK 2 sind für die obstbauliche Praxis verwendbar.
- 3 Der im Test ermittelte HI muss vor der Freigabe einer neuen Sorte unter Verwendung verschiedener Virusstämme bestätigt werden.
- 4 Ebenso ist eine mehrjährige Prüfung der Hypersensibilitätsresistenz unter natürlichen Infektionsbedingungen an verschiedenen Standorten erforderlich.
- 5 Die mangelhafte Prüfung des Resistenzgrades kann zur Freigabe von Sorten führen, die bei Einwirkung von biotischem oder abiotischem Stress (z. B. Trocken-

heit, Infektionen mit rindenschädigenden Pathogenen, Überbehang) nicht mehr in der Lage sind, das Scharkavirus zu isolieren. In der Folge sterben Zweige und Äste ab, es entwickeln sich Blattspreitennekrosen und damit ein Krankheitssyndrom, das insgesamt demjenigen PPV-infizierter Bäume der Sorte 'Ortenauer' ähnelt.

Bei Genotypen, die unter Anwendung der genannten Selektionskriterien ausgewählt wurden, ist die Gefahr, dass ihre Feldresistenz gegenüber PPV durchbrochen wird, als sehr gering einzustufen.

Nutzung hypersensibler Genotypen als Unterlagen. Der Vorschlag, hypersensible Genotypen als Unterlagen zu verwenden, wurde erstmals von KEGLER et al. (1991) formuliert. Ihm liegt folgender Gedankengang zugrunde: Wird eine PPV-sensible Pflanze, die auf eine hypersensible Unterlage veredelt ist, mit dem Scharkavirus infiziert, müsste sie absterben, da sie von der Unterlage abgestoßen wird. Damit käme es zu einer Art „Selbstreinigung“ der Anlage, weil infizierte Pflanzen, die ohnehin gerodet werden müssten, selbsttätig absterben würden. Die Verwendung derartiger Unterlagen wäre nur in Gebieten ohne starken Infektionsdruck sinnvoll, da ansonsten innerhalb weniger Jahre die gesamte Anlage zusammenbrechen könnte. Die von KEGLER et al. beschriebenen Genotypen reagierten allerdings nur gegenüber einigen Virusisolaten mit HR, so dass der Ansatz der Verwendung als Unterlage nicht sinnvoll verfolgt werden konnte.

Mit den nun vorliegenden Erkenntnissen über die Hypersensibilität der aus der Kreuzungskombination zwischen 'Ortenauer' und 'Stanley' abstammenden hypersensiblen Genotypen gewinnt die Überlegung, hypersensible Unterlagen zu nutzen, an Bedeutung. Dabei kommt ein weiterer Aspekt der Verwendung derartiger Unterlagen zum Tragen: Für scharkafreie Gebiete stellt infiziertes Pflanzmaterial die größte Gefahr der Einschleppung der Krankheit dar. Wie oben dargestellt, verhindert die Verwendung hypersensibler Edelsorten zuverlässig den Import virusbefallenen Pflanzguts in diese Regionen. Da-

mit werden aber scharkasensible Sorten, die dort traditionell im Anbau stehen, vollständig zurückgedrängt. Stünden hypersensible Unterlagen zur Verfügung, könnten sensible Genotypen auf diese veredelt werden und mit der Gewähr, scharkavirusfrei zu sein, in PPV-freien Gebieten gepflanzt werden.

Hypersensible Unterlagen könnten darüberhinaus auch für hypersensible Edelsorten verwendet werden. Werden scharkasensible Unterlagen für hypersensible Edelsorten verwendet, können die Unterlagen über Wurzeläusläufer oder Stockausschläge vom Scharkavirus befallen werden. Der theoretischen Betrachtung nach wäre es dann zwingend, dass der aufveredelte hypersensible Partner der Sorten-Unterlagen-Kombination abstirbt. Bei hypersensiblen Unterlagen wäre dies ausgeschlossen, da diese virusfrei sind. Relativierend muss angemerkt werden, dass das Problem der potenziellen Infektion der Unterlagen bei Veredlungskombinationen mit hypersensiblen Edelreisern in der Praxis bislang keine Rolle spielt: Nach den bisherigen, 17jährigen Erfahrungen mit hypersensiblen Sorten an Standorten mit hohem PPV-Befallsdruck bleibt ein Befall der Unterlagen ohne Auswirkungen auf die Veredlungskombination. Dieser Sachverhalt bedarf in der Zukunft ebenso einer genaueren Untersuchung wie das Verhalten sensibler Edelsorten auf hypersensiblen Unterlagen. Hierbei sind stets Versuche an einjährigen wie auch an mehrjährigen Pflanzen durchzuführen, um eine möglicherweise vorhandene Abhängigkeit der Reaktion auf Pathogenbefall vom Alter bzw. der Größe des Baumes zu berücksichtigen.

Überdies könnten auf Unterlagen der Art *Prunus domestica* auch Vertreter der Aprikose und womöglich des Pfirsichs veredelt werden. Damit könnten Vorteile der Hypersensibilität gegenüber PPV für diese Obstarten nutzbar gemacht werden: Es wäre sichergestellt, dass nur PPV-freies Pflanzmaterial die Baumschule verlässt. Innerhalb von Sorten der Art *Prunus persica* konnte bislang weder quantitative noch qualitative Scharkaresistenz aufgefunden werden (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al. 2004, DECROOCQ et al. 2005). Entsprechend groß ist die Dringlichkeit, mögli-

che Wege zu finden, den Pfirsichanbau vor Auswirkungen der Scharkkrankheit zu schützen.

Interspezifische Hybridisierungen. Hypersensibilität gegenüber PPV ist innerhalb der Gattung *Prunus* bislang nur bei Vertretern der Art *Prunus domestica* bekannt. Durch interspezifische Hybridisierung wäre es der Überlegung nach möglich, diesen Resistenzmechanismus in andere Obstarten der Gattung *Prunus* zu übertragen. Denkbar sind Kreuzungen hypersensibler Genotypen der Europäischen Pflaume mit Vertretern der Arten *P. persica*, *P. armeniaca*, *P. amygdalis* und *P. salicina* mit dem Ziel, die Resistenz in Sorten von Pfirsich, Aprikose, Mandel und Japanischer Pflaume zu übertragen. Für die Unterlagenzüchtung könnten sich Hybridisierungen mit *P. cerasifera*, *P. spinosa*, *P. tomentosa* und als Unterlagen verwendeten Mehrfachhybriden eignen. Vereinzelt Berichte über derartige Hybridisierungen liegen vor (OKIE und WEINBERGER 1996). Insbesondere Kreuzungen der Europäischen Pflaume mit Schlehe und Myrobalane dürften aufgrund der engen verwandtschaftlichen Verhältnisse einfach zu realisieren sein. Nachkommen aus Hybridisierungen mit diploiden Arten wie der Myrobalane weisen eine niedrigere Ploidiestufe auf als Vertreter von *P. domestica*. Dies

würde die Untersuchung der genetischen Grundlagen der Hypersensibilität wesentlich vereinfachen.

Pyramidisierung von Resistenzgenen. HARTMANN (2001) führt als Zuchtziel die Kombination der Hypersensibilitätsresistenz mit der quantitativen PPV-Resistenz an. Die vorliegenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Anteil hypersensibler Genotypen in Nachkommenschaften von Kreuzungen hypersensibler mit quantitativ resistenten Sorten gering ist. Es ist zumindest nicht ausgeschlossen, dass bei quantitativ resistenten und zugleich hypersensiblen Sorten die Viruskonzentration so gering ist, dass eine hypersensible Reaktion auch nach Inokulation durch Doppelpfropfung phänotypisch nicht erkennbar ist. Dies ist zukünftig anhand umfangreicher Kreuzungsnachkommenschaften zu prüfen. Beispielsweise eignen sich dazu Hybriden zwischen hypersensiblen Genotypen und der quantitativ resistenten Sorte 'Mirabelle von Nancy'. Genotypen, in denen beide Resistenztypen genetisch verankert sind, könnten einen Beitrag zur langfristigen Sicherung der Stabilität der PPV-Resistenz im Feld leisten. Hierfür sind aber zunächst die vorhandenen Resistenztestsysteme anzupassen, um eine zuverlässige und effektive Selektion zu ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Die Scharkakrankheit ist bezüglich der wirtschaftlichen Schäden, die sie verursacht, die im europäischen Steinobstanbau bedeutendste Virose. Sie breitet sich weltweit in raschem Tempo aus. Quarantänemaßnahmen konnten diesen Prozess nur verlangsamen. Der Erreger der Krankheit, das *Plum pox virus* (PPV), bedroht den Anbau von Pflaume, Zwetsche, Aprikose und Pfirsich, darüber hinaus befällt er die Kirsche. Gegen das Virus immune Genotypen sind bei der Europäischen Pflaume (*Prunus domestica* L.) nicht bekannt. Bisherige Züchtungsbemühungen bei *Prunus domestica* konzentrierten sich deshalb auf die Gewinnung scharkatoleranter und quantitativ resistenter Sorten. Der Grad dieser Toleranz und Resistenz ist stark von Umweltfaktoren und dem Virusisolat, das die Pflanzen befällt, abhängig. In den zurückliegenden Jahren traten auch bei den im Anbau befindlichen fruchttoleranten oder quantitativ resistenten Sorten verstärkt wirtschaftliche Schäden auf.

Ein grundlegend anderer Resistenzmechanismus gegenüber der Scharkakrankheit ist die Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV. Sie führt zu einer vollständigen Feldresistenz gegenüber dem Virus.

Ausprägungsformen der Hypersensibilität. Um die Bandbreite der möglichen Ausprägungsformen der Hypersensibilität der Europäischen Pflaume gegenüber PPV abzuschätzen und die Vererbung der Eigenschaft zu analysieren, wurde an der Universität Hohenheim die Reaktion von mehr als 1150 Genotypen, die aus Kreuzungen zwischen sensiblen und hypersensiblen Genotypen entstanden waren, auf Inokulation durch Doppelpfropfung mit PPV-infizierter Zwischenveredlung untersucht. Hypersensible Genotypen zeigten im Testsystem Nekrosen auf den Blatt-

spreiten und an den Sprossachsen sowie Triebspitzendürre. In jeder der Nachkommenschaften traten sensibel und hypersensibel reagierende Genotypen auf, aber auch Hybriden, die aufgrund ihrer Symptome zwischen diesen beiden Extremen eingeordnet wurden. Phänotypisch betrachtet ist die Hypersensibilität demnach ein quantitatives Merkmal. Um den Grad der Hypersensibilität eines Genotyps zu beschreiben, wurden der Hypersensibilitätsindex, der auf Boniturdaten der wichtigsten Merkmale der Hypersensibilität beruht, und die davon abgeleiteten Hypersensibilitätsklassen entwickelt. Nur Genotypen, die zwei der vier Klassen zugeordnet werden können, sind für den Anbau von Bedeutung.

Vererbung. Möglichst umfassende Kenntnisse über die Vererbung der Hypersensibilität der Pflaume gegenüber PPV sind die Voraussetzung für eine erfolgreiche Nutzung dieses Resistenzmechanismus in der Züchtung. Ziel der Untersuchungen war es, Informationen über die Vererbung dieser Eigenschaft zu gewinnen.

Der Anteil hypersensibler Nachkommen schwankte in den 18 untersuchten Kreuzungskombinationen zwischen 0% und 88%. Die im Hohenheimer Züchtungsmaterial verankerte Hypersensibilität, die auf Sämlinge der Kreuzung 'Ortenauer' × 'Stanley' (z. B. die Sorte 'Jojo') zurückgeht und gegen alle bislang getesteten PPV-Isolate wirkt, wurde signifikant besser vererbt als die in Nachkommen der Pflaumenhybride 'K4' determinierte, die virusisolatspezifisch ist. Hinsichtlich des Anteils hypersensibler Nachkommen bestanden große Unterschiede in der Kombinationseignung verschiedener Genotypen. Kreuzungen des hypersensiblen Genotyps 'Jojo' mit geschmacklich sehr wertvollen, jedoch scharkafälligen Sorten wie 'Fellenberg' und 'Felsina'

erbrachten entgegen den Erwartungen einen sehr hohen Anteil hypersensibler Nachkommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Hypersensibilitätsresistenz gegen PPV kerngenomisch codiert wird. Eine oligogene Determinierung im hexaploiden Genom von *Prunus domestica* kann angenommen werden.

Entwicklung von DNA-Markern. Für die Europäische Pflaume sind bislang keine DNA-Marker beschrieben, die zur markergestützten Selektion für bestimmte Eigenschaften genutzt werden könnten. Ziel war es, einen gangbaren Weg zur Gewinnung molekularer Marker für die Hypersensibilität aufzuzeigen. Dazu wurde eine Kreuzungsnachkommenschaft ('Jojo' × 'Felsina') mit 131 Individuen ausgewählt, deren Hypersensibilitätsindices im Rahmen der Untersuchungen zur Vererbung der Eigenschaft ermittelt worden waren. Unter Anwendung der *bulk segregant analysis* wurde nach AFLP-Fragmenten gesucht, die Polymorphismen im Bandenmuster bedingen und damit potenziell in Korrelation zum untersuchten Merkmal stehen. 14 derartige Banden wurden sequenziert. Für die Amplifizierung einiger dieser Sequenzen wurden spezifische Primer entwickelt. Mittels Gelelektrophorese, Restriktionsverdau und SSCP wurde nach Unterschieden in den mit den Primern amplifizierten PCR-Produkten, die auf die DNA der beiden Elternsorten zurückgingen, gesucht. In der SSCP-Analyse zeigten sich bei mit einem von vier untersuchten Primerpaaren amplifizierten PCR-Produkten Polymorphismen. Diese PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Es konnte die Existenz von sieben Allelen nachgewiesen werden, die sich durch Punktmutationen (Basenaustausch, Deletion) voneinander unterscheiden. Eines dieser Allele kommt in beiden Elternsorten vor, jeweils drei sind spezifisch für den anfälligen beziehungsweise hypersensiblen Elternteil. Ein Vorschlag zum Design von allelspezifischen Primern wurde vorgelegt. Damit liegt eine putativ als DNA-Marker für die Hypersensibilität geeignete DNA-Sequenz vor.

Die für *Prunus domestica* verwendete Methodik wurde als für die Entwicklung molekularer Marker für die Hypersensibilität (und ggf. andere Merkmale) geeignet befunden.

Histochemie der Pathogenabwehr. Es konnte erstmals nicht nur durch visuelle Beobachtungen, sondern durch den Nachweis biochemischer Indikatoren gezeigt werden, dass die nach PPV-Infektion zu beobachtenden Absterbeerscheinungen bei Genotypen der Europäischen Pflaume eine hypersensible Reaktion darstellen. Durch die Entwicklung einer speziellen PPV-Inokulationsmethode für Blätter konnte die PPV-bedingte Induktion der Bildung von Superoxidanionen in den Blättern der hypersensiblen Zwetschensorte 'Jojo' nachgewiesen werden. Bei Genotypen, die auf massive Virusinokulation mit der Bildung von Blattspreitennekrosen reagierten, wurde eine starke Akkumulation von Salicylsäure und von Wasserstoffperoxid beobachtet. Sensible Genotypen reagierten weder mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies noch mit einer Erhöhung der Salicylatkonzentration in den Blättern.

Zur Lokalisierung von PPV im Blattgewebe wurde eine immunhistochemische Methode entwickelt, die auf der Immunogold-Silverstaining-Technik basiert. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Ausbreitung des Virus im Blatt umso stärker behindert wird, je stärker die Hypersensibilität ausgeprägt ist. In PPV-empfindlichen Genotypen fand sich das Virus in weiten Bereichen der Blattspreite.

Ausblick. Die Nutzung hypersensibler Genotypen eröffnet erstmals die Möglichkeit, die Ausbreitung des Scharkavirus in bislang befallsfreie Gebiete wirksam zu unterbinden. Für Scharkabefallsgebiete stellt der Anbau hypersensibler Sorten die derzeit einzige Möglichkeit dar, PPV-bedingte wirtschaftliche Schäden nicht nur zu minimieren, sondern zu vermeiden. Die vorgelegten Ergebnisse zur Vererbung der Hypersensibilität zeigen, wie dieser Resistenzmechanismus effektiv in der Züchtung neuer Sorten eingesetzt werden kann. Die Züchtung gegenüber PPV hypersensibler Sorten ist der zur Zeit meistversprechende Weg zur Lösung der Scharkaproblematik im Obstbau. Dabei ist auch an interspezifische Hybridisierungen zur Gewinnung hypersensibler Unterlagen zu denken. Die Hypersensibilität kann auch für der Europäischen Pflaume verwandte Arten wie die Japanische Pflaume, den Pfirsich und die Aprikose eine neue Strategie in der Bekämpfung der Scharkavirose darstellen.

8 Summary: The hypersensitivity of European Plum (*Prunus domestica* L.) to Sharka virus (*Plum pox virus*)

■ In terms of economic damage, sharka is the most important virus disease in stone fruit crops in Europe. It is spreading rapidly all over the world. Quarantine measures have only decelerated this process. The causative agent of sharka disease, the *Plum pox virus* (PPV), threatens the cultivation of plum, prune, apricot and peach. Moreover, cherry trees are infected. Genotypes immune to the virus are not known within the species *Prunus domestica* L. (European plum). Therefore, previous breeding programs for *Prunus domestica* aimed at producing new varieties tolerant or quantitatively resistant to PPV. To a great extent, the degree of this tolerance or resistance depends on environmental factors and on the virus isolate infecting the plant. For several years even widespread varieties which were known not to show remarkable symptoms on fruits or to be quantitatively resistant have suffered more and more from Sharka disease. Therefore, PPV causes increasing economic damage.

The hypersensitivity of European plum against PPV implies a basically different mechanism of resistance. Hypersensitive genotypes remain healthy in the orchard and are therefore completely field resistant to PPV.

Types of symptoms characteristic for the hypersensitive defense response. In order to define the range of symptoms typical of hypersensitivity, the response of more than 1 150 genotypes of *Prunus domestica* originating from crossings between sensitive and hypersensitive genotypes to inoculation with PPV was tested using the double grafting method with a PPV infected interstem at

University of Hohenheim. The inheritance of the hypersensitivity was investigated. In this test system, hypersensitive genotypes show necrosis on the leaves and on the stems as well as death of young shoot tips. Among the descendants of all the crossing combinations tested, both sensitive and hypersensitive genotypes appeared as well as hybrids showing characteristics of both sensitivity and hypersensitivity. Thus, the members of the latter group were categorized in between the two extreme forms of reaction to inoculation with PPV. From the phenotypical point of view, hypersensitivity is a quantitative trait. In order to be able to describe the degree of hypersensitivity of an individual genotype, the ratings of the most important characteristics of hypersensitivity were used to describe the index of hypersensitivity. Hybrids with a similar value of hypersensitivity index were grouped in four classes of hypersensitivity. Only members of two classes are of high pomological value.

Inheritance. Detailed knowledge on the inheritance of hypersensitivity of European plum against PPV is a prerequisite for the successful use of this resistance mechanism in breeding programs. The aim of the investigations was to gather information on the inheritance of this trait.

The proportion of hypersensitive seedlings within the 18 crossing combinations investigated varied within a range from 0% to 88%. The hypersensitivity fixed in the Hohenheim gene pool, originating from the crossing 'Ortenauer' × 'Stanley' (e. g. the variety 'Jojo') and effective to all PPV isolates tested up to now showed a signifi-

cantly better heredity than the one in descendants of 'K4'-hybrid, the hypersensitivity of which is specific to certain virus isolates. Concerning the percentage of hypersensitive descendants there were major differences in the combining ability of different genotypes. Unexpectedly, crossings between the hypersensitive variety 'Jojo' and varieties which are of high pomological value due to the excellent taste of their fruits, but highly PPV sensitive (like 'Fellenberg' or 'Felsina') resulted in a high percentage of hypersensitive seedlings. It was shown that the resistance against PPV mediated by hypersensitivity is encoded in the chromosomal DNA. It can be assumed that the hypersensitivity of European plum against PPV is controlled oligogenically.

Development of DNA markers. Up to now, there have been no reports about DNA markers which could be used for marker assisted selection in the breeding of *Prunus domestica*. The research aimed at showing a possible way for developing molecular markers for hypersensitivity. For that purpose, an offspring ('Jojo' × 'Felsina') consisting of 131 individuals with known indexes of hypersensitivity was chosen among all the progenies tested. Using bulk segregant analysis, the AFLP method was applied looking for polymorphisms in band patterns. 14 fragments assumed to correlate with hypersensitivity were sequenced. Specific primer pairs were designed for amplifying some of these fragments. Using gel electrophoresis, digestion with restrictionendonucleases and SSCP analysis the PCR products of 'Jojo' and 'Felsina' were screened for differences. SSCP analysis revealed differences in the PCR products amplified using one out of four primer pairs. The cloning and sequencing of the DNA fragments amplified using this primer pair revealed the existence of seven alleles differing in point mutations (single-base substitution, deletion). One of these alleles exists in both 'Jojo' and 'Felsina', three at a time are specific to the sensitive or hypersensitive parent, respectively. A proposal for the design of a primerpair specific to the alleles was pointed out. So a putative DNA marker for hypersensitivity of European plum is available.

The method used for *Prunus domestica* was regarded as suitable for developing molecular

markers for hypersensitivity (or other traits of interest).

Histochemistry of pathogen defence. For the first time it was shown, not only based on visible observations but by proving the appearance of biochemical indicators, that the symptoms hypersensitive genotypes of European plum show after inoculation with PPV represent a type of hypersensitive response. Using a newly developed method of inoculating leaves of European plum with PPV the generation of superoxide anions due to the presence of PPV in leaves of the hypersensitive variety 'Jojo' was demonstrated. Genotypes showing necrosis on lamina after massive inoculation with PPV were found to accumulate salicylic acid and hydrogen peroxide in the leaves. In case of sensitive genotypes, neither an accumulation of reactive oxygen species nor an increase in salicylic acid content was registered.

For localising of PPV in leaf tissues, an immunohistochemical method based on the immunogold silver staining technique was developed. With this it was shown that the spread of the virus within the leaf was restricted the more, the higher the degree of hypersensitivity of the respective genotype was. In genotypes sensitive to PPV, the virus was found in large areas of the leaf.

Prospects. The availability of hypersensitive genotypes provides, for the first time, the opportunity of reliably preventing the spread of Sharka virus into areas that have been free from PPV so far. For regions where PPV is prevalent, the cultivation of hypersensitive genotypes is the only possibility of not only minimizing the economic damage caused by Sharka disease but also of avoiding it. The results presented concerning the heritability of the hypersensitivity show how to use this mechanism of resistance for breeding new cultivars efficiently. Presently, the breeding of varieties hypersensitive to PPV is the most promising approach for solving the problem of Sharka disease. In this respect, interspecific hybridisations for producing hypersensitive rootstocks have to be taken into account. Hypersensitivity might also be a promising tool for solving the Sharka problem of species related to the European plum like Japanese plum, peach and apricot.

Quellenverzeichnis

- ADAMS, A. N., 1978: The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Annals of Applied Biology* **90**: 215–221
- ADAMS, A. N. und PATTERSON, V. S. A., 1980: Plum pox virus. East Malling Research Station Report for 1979, 104
- ADAMS, A. N., GUISE, C. M. und CROSSLEY, S. J., 1999: Plum pox virus detection in dormant plum trees by PCR and ELISA. *Plant Pathology* **48**: 240–244
- ALVAREZ, M. E., 2000: Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* **44**: 429–442
- ATANASOFF, D., 1933: Plum Pox. A new virus disease. *Jahrbuch der Universität Sofia (Bulgarien) 1932/33*, Landwirtschaftliche Fakultät **11**: 46–49
- ATANASOFF, D., 1935: Mosaik of stone fruits. *Phytopathologische Zeitschrift* **8**: 259–284
- BADENES, M. L. und PARFITT, D. E., 1995: Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 1035–1041
- BADENES, M. L., HURTADO, M. A., SANZ, F., ARCHELOS, D. M., BURGOS, L., EGEA, J. und LLÁCER, G., 2000: Searching for molecular markers linked to male sterility and self-compatibility in apricot. *Plant Breeding* **119**: 157–160
- BALLESTER, J., SOCIAS I COMPANY, R., ARUS, P. und DE VICENTE, M.C., 2001: Genetic mapping of a major gene delaying blooming time in almond. *Plant Breeding* **120**: 268–270
- BAULCOMBE, D. C., 1999: Viruses and gene silencing in plants. *Archives of Virology* **15**: 189–201
- BAULCOMBE, D. C., CHAPMAN, S. und CRUZ, S. S., 1995: Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal* **7**: 1045–1053
- BEVAN, M. W., MASON, S. E. und GOELET, P., 1985: Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. *EMBO Journal* **4**: 1921–1926
- BIVOL, T., IGNAT, V. F., KUKURUSAK, E. A. und KEGLER, H., 1987: Experiments on resistance of plum varieties and hybrids to plum pox virus in Moldavia. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **23**: 443–449
- BIVOL, T., MEYER, U., VERDEREVSKAJA, T. D. und KEGLER, H., 1988: Nachkommenschaftsprüfung von Pflaumenhybriden auf Scharkaresistenz. *Archiv für Züchtungsforschung* **18**: 385–392
- BIVOL, T., VERDEREVSKAJA, T. D., KUKURUSAK, E. A. und LAHMATOVA, I. T., 1989: The initial heritability of plum hybrids susceptibility to sharka (plum pox) virus. Recent results in plant virology. *Jahresbericht des Instituts für Phytopathologie Aschersleben*, 7–8
- BLYSTAD, D.-R., KNUDSEN, R., HJELTNES, S. H. und MUNTHE, T., 2004: The occurrence of plum pox virus in Norway. In: VANGDAL, E. (Hrsg.): *The 8th International Symposium on*

- Plum and Prune (ISHS), Lofthus (Norwegen), 05.–09.09.2004, Book of Abstracts, 25
- BOEGLIN, M., QUIOT, J. B. und LABONNE, G., 2004: Risk assessment of contamination of cherry trees by *Plum pox virus* in France. *Acta Horticulturae* (ISHS) 657: 221–224
- BOUHADIDA, M., CASAS, A. M., MORENO, M. A. und GOGORCENA, Y., 2004: Genetic diversity of *Prunus* rootstocks using microsatellite markers. *Acta Horticulturae* (ISHS) 663: 625–628
- BOURDIN, D. und LECOQ, H., 1991: Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses are involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infection. *Phytopathology* 81: 1459–1464
- BRADEEN, J. M. und SIMON, P. W., 1998: Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y₂ locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 960–967
- BRIGNETI, G., VOINNET, O., LI, W. H., DING, S. W. und BAULCOMBE, D. C., 1998: Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17: 6739–6746
- BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY, 1950: Definitions of some terms used in plant pathology. *Transactions of the British Mycological Society* 33: 154–160
- BRUGMANS, B., VAN DER HULST, R. G. M., VISSER, R. G. F., LINDHOUT, P. und VAN ECK, H. J., 2003: A new versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Research* 31: e55
- BUCHTER, H., HARTMANN, W. und STÖSSER, R., 1987: Anatomisch-histologische Veränderungen bei scharkakranken Trieben und Wurzeln. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 94: 46–57
- CALENGE, F., VAN DER LINDEN, C. G., VAN DE WEG, E., SCHOUTEN, H. J., VAN ARKEL, G., DENANCÉ, C. und DUREL, C.-E., 2005: Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 660–668
- DA CÂMARA MACHADO, A., KNAPP, E., PÜHRINGER, H., SEIFERT, G., HANZER, V., WEISS, H., KATINGER, H. und LAIMER DA CÂMARA MACHADO, M., 1994a: Approaches to pathogen-mediated resistance breeding against plum pox potyvirus in stone-fruit trees. *EPPO Bulletin* 24: 697–704
- DA CÂMARA MACHADO, A., KNAPP, E., PÜHRINGER, H., HANZER, V., WEISS, H., WANG, Q., KATINGER, H. und LAIMER DA CÂMARA MACHADO, M., 1994b: Progress in pathogen-mediated resistance breeding against plum pox virus. *Acta Horticulturae* (ISHS) 386: 318–326
- CASAS, A. M., IGARTUA, E., BALAGUER, G. und MORENO, M. A., 1999: Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica* 110: 139–149
- CHALHOUB, B. A., THIBAUT, S., LAUCOU, V., RAMEAU, C., HÖFTE, H. und COUSIN, R., 1997: Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques* 22: 216–220
- CHRISTOFF, A., 1947: Shakarta po slivite. *Izvert. na Kam. na nar. kultura. Ser. Biol. Zemed. Lesovod.* 1: 261–296
- CLARK, M. F. und ADAMS, A. N., 1977: Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475–483
- COMAN, T. und COCIU, V., 1976: Transmission de la Sharka par le pollen et par les graines. *Bulletin d'Information Sharka* 2: 15–21
- COOPER, J. I. und JONES, A. T., 1983: Responses of plants to viruses: Proposals for the use of terms. *Phytopathology* 73: 127–128
- CRANE, M. und LAWRENCE, W., 1931: Studies in sterility. *Proceedings of the 9th International Horticultural Congress*, 100–116
- DECROOQ, V., HAGEN, L. S., FAVÉ, M.-G., EYQUARD, J.-P. und PIERRONNET, A., 2004: Microsatellite markers in the hexaploid *Pru-*

- nus domestica* species and parentage lineage of three European plum cultivars using nuclear and chloroplast simple-sequence repeats. *Molecular Breeding* **13**: 135–142
- DECROOCQ, V., FOULONGNE, M., LAMBERT, P., LE GALL, O., MANTIN, C., PASCAL, T., SCHURDILEVRAUD, V. und KERVELLA, J., 2005: Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genetics and Genomics* **272**: 680–689
- DINESH-KUMAR, S. P. und BAKER, B. J., 2000: Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1908–1913
- DIRLEWANGER, E., PRONIER, V., PARVERY, C., ROTHAN, C., GUYE, A. und MONET, R., 1998: Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 888–895
- DIRLEWANGER, E., GRAZIANO, E., JOOBEUR, T., GARRIGA-CALDERE, F. und COSSON, P., 2004: Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9891–9896
- DJOUVINOV, V. und VITANOVA, I., 2000: Production, processing and marketing of plums in Bulgaria. *Proceedings of the First International Scientific Symposium on Production, Processing and Marketing of Plum and Plum Products*, 09.–11.09.2000, Kostunici (Jugoslawien), 91–96
- DOKE, N. und OHASHI, Y., 1988: Involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **32**: 163–175
- DOKE, N., YOSHIOKA, H., SUGIE, K., NUMATA, N., NAKAJIMA, K., PARK, H.-J., SUNAZAKI, N., YAMASHITA, M., KAWAKITA, K. und KATOU, S., 2005: The superoxide-generating NADPH oxidase in plants: Its molecular basis and role in induction of local and systemic induced resistance against pathogens. In: TSUYUMU, S., LEACH, J. E., SHIRAIISHI, T. und WOLPERT, T.: *Genomic and Genetic Analysis of Plant Parasitism and Defence*. The American Phytopathological Society, 195–206
- DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K. und MATTICK, J. S., 1991: 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**: 4008
- DONDINI, L., COSTA, F., TATARANNI, G., TARTARINI, S. und SANSVINI, S., 2004: Cloning of apricot RGAs (Resistance Gen Analogues) and development of molecular markers associated with Sharka (PPV) resistance. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **79**: 729–734
- DOSBA, F., MAISON, P., LANGSAC, M. und MASSONIE, G., 1987: Experimental transmission of plum pox virus (PPV) to *Prunus mahaleb* and *Prunus avium*. *Journal of Phytopathology* **120**: 199–204
- DOSBA, F., LANSAC, M. und EYQUARD, J. P., 1994: Résistance des *Prunus* à la sharka. *EPPO Bulletin* **24**: 691–696
- DRENKARD, E., RICHTER B. G., ROZEN, S., STUTIUS, L. M., ANGELL, N. A., MINDRINOS, M., CHO, R. J., OEFNER, P. J., DAVIS, R. W. und AUSUBEL, F. M., 2000: A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphisms facilitates map-based cloning in Arabidopsis. *Plant Physiology* **124**: 1483–1492
- DREWS, G., ADAM, G. und HEINZE, G., 2004: *Molekulare Pflanzenviologie*. Springer Verlag, Berlin (S. 237ff.)
- ELLINGER, W., 2004: ZMP-Marktbilanz Obst 2004. Deutschland. Europäische Union. Weltmarkt. ZMP Zentrale Markt- und Preisberichterstattungsstelle, Bonn
- ELSTNER, E. F., OßWALD, W. und SCHNEIDER, I., 1996: *Phytopathologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation), 2003: *Cartes de répartition géographique des organismes de quaran-*

- taine pour l'Europe: Plum pox virus. Website der European and Mediterranean Plant Protection Organization, http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Plum_pox_virus/PPV000_ds.pdf (Stand: 29.01.2005)
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation), 2004: Diagnostic protocols for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. EPPO Bulletin **34**: 247–256
- ERYOMINE, G. V., 1991: New data on origin of *Prunus domestica* L. Acta Horticulturae **283**: 27–29
- ETZOLD, H., 2002: Simultanfärbung von Pflanzenschnitten mit Fuchsin, Chrysoidin und Astrablau. Mikrokosmos **91**: 316–318
- FANIGLIULO, A., COMES, S., MAISS, E., PIAZZOLLA, P. und CRESCENZI, A., 2003: The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationship within the species. Archives of Virology **148**: 2137–2153
- FANIGLIULO, A., COMES, S. und CRESCENZI, A., 2004: Evaluation of cherry cultivars for their response to infection by *Plum pox virus* sweet cherry strain. Acta Horticulturae (ISHS) **657**: 309–320
- FAOSTAT data, 2004. Landwirtschaftliche Datenbank der Food and Agricultural Organization (FAO) der Vereinten Nationen, Rom, <http://faostat.fao.org/faostat>, Stand: 17. Mai 2005
- FEDERATION OF BRITISH PLANT PATHOLOGISTS, 1973: A guide to the use of terms in plant pathology. Phytopathological Paper Nr. 17, Commonwealth Mycological Institute (Kew, Surrey, England)
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R., MOURIÑO, M., RIVERA, J., RODRÍGUEZ, F., PLANA-DURÁN, J. und GARCÍA, J. A., 2001: Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. Virology **280**: 283–291
- FISCHER, M., LIEBER, B., HERZOG, U., ERNST, I., GRÜNTZIG, M. und FUCHS, E., 2002: Untersuchungen zur Scharka-Krankheit der Pflaume. I. Langjährige Beobachtungen zum Verhalten verschiedener Genotypen von *Prunus domestica* L., *P. cerasifera* Erh. und *P. insititia* L. gegenüber dem Plum pox virus (PPV) unter natürlichen Infektionsbedingungen. Erwerbsobstbau **44**: 105–118
- FLOR, H. H., 1956: The complementary genic system in flax and flax rust. Advances in Genetics **8**: 29–54
- FRASER, R. S. S., 1985a: Some basic concepts and definitions in resistance studies. In: FRASER, R. S. S. (Hrsg.): Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Martinus Nijhoff/Junk Publishers, Dordrecht, 1–12
- FRASER, R. S. S., 1985b: Mechanisms of induced resistance to virus disease. In: FRASER, R. S. S. (Hrsg.): Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Martinus Nijhoff/Junk Publishers, Dordrecht, 373–404
- FRASER, R. S. S., 1987: Biochemistry of Virus-Infected Plants. Research Studies Press, Letchworth, 259 S.
- FRASER, R. S. S., 1990: The genetics of resistance to plant viruses. Annual Review of Phytopathology **28**: 179–200
- FRASER, R. S. S., 2000a: Resistance to tobacco mosaic virus in tobacco plants. In: SLUSARENKO, A. J., FRASER, R. S. S. und VAN LOON, L. C. (Hrsg.): Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1–19
- FRASER, R. S. S., 2000b: Special aspects of resistance to viruses. In: SLUSARENKO, A. J., FRASER, R. S. S. und VAN LOON, L. C. (Hrsg.): Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 479–520
- FRÖHLICH, G., 1991: Phytopathologie und Pflanzenschutz. Gustav Fischer Verlag, Jena, 2. Aufl.
- FUCHS, E., GRÜNTZIG, M., KEGLER, H., KRZAL, G. und AVENARIUS, U., 1994: A greenhouse test for characterizing PPV-strains. Acta Horticulturae (ISHS) **386**: 376–382

- DE GARA, L., DE PINTO, M. C. und TOMMASI, F., 2003: The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 863–870
- GARCÍA, J. A., CERVERA, M. T., RIECHMANN, J. L. und LÓPEZ-OTÍN, C., 1993: Inhibitory effects of human cystatin C on plum pox potyvirus proteases. *Plant Molecular Biology* **22**: 697–701.
- GARCÍA, J. A., RIECHMANN, J. L., LAÍN, S., MARTÍN, M. T., GUO, H., SIMON, L., FERNÁNDEZ, A., DOMÍNGUEZ, E. und CERVERA, M. T., 1994: Molecular characterization of plum pox potyvirus. *EPP0 Bulletin* **24**: 543–553
- GARNSEY, S. M., GOTTWALD, T. R. und YOKOMI, R. K., 1998: Control strategies for Citrus tristeza virus. In: HADIDI, A., KHETARPAL, R. K. und KOGANEZAWA, H. (Hrsg.): *Plant Virus Disease Control*. ASP Press, St. Paul (Minnesota), 639–658
- GERLACH, D., 1969: *Botanische Mikrotechnik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 298 S.
- GLASA, M. und CANDRESSE, T., 2005: Partial sequence analysis of an atypical Turkish isolate provides further information on the evolutionary history of Plum pox virus (PPV). *Virus Research* **108**: 199–206
- GLASA, M., PALKOVICS, L., KOMÍNEK, P., LABONNE, G., PITTNEROVÁ, S., KUDELA, O., CANDRESSE, T. und SUBR, Z., 2004: Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology* **85**: 2671–2681
- GOODMAN, R. N. und NOVACKY, A. J., 1994: *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. ASP Press, St. Paul
- GOTTSCHALK, W., 1994: *Allgemeine Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl. (S. 73)
- GREGOR, D., HARTMANN, W. und STÖSSER, R., 1994: Cultivar identification in *Prunus domestica* using random amplified polymorphic DNA markers. *Acta Horticulturae (ISHS)* **359**: 33–40
- GRÜNTZIG, M., ERNST, I., HERZOG, U., KEGLER, H., FISCHER, M. und FUCHS, E., 2001: Zum Verhalten von *Prunus armeniaca* L. und *P. domestica* L. gegenüber dem *Plum pox virus* (PPV). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **34**: 435–462
- GUTMANN, M., 1993: Localization of proanthocyanidins using in situ-hydrolysis with sulfuric acid. *Biotechnic and Histochemistry* **68**: 161–165
- GUTMANN, M., 1995: Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. *Journal of Microscopy* **179**: 277–281
- HAMDORF, G. und HEIN, K., 1989: Untersuchungen über die Anfälligkeit von Pflaumen- und Zwetschensorten gegenüber dem Scharka-Virus (*Plum pox virus*). Landespflanzenchutzamt Mainz (Rheinland-Pfalz), 166 S.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. und JONES, D. G. J., 1996: Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**: 1773–1791
- HAMMOND-KOSACK, K. E. und PARKER, J. E., 2003: Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177–193
- HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES, F. T. und GENEVE, R. L., 1997: *Plant Propagation – Principles and Practices*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 6. Auflage (S. 392ff.)
- HARTMANN, W., 1990: Das Scharkaproblem im Zwetschenanbau und die Frage der Sortentoleranz bzw. -resistenz. *Obstbau* **15**: 390–393
- HARTMANN, W., 1994: Plum production in Germany. *Acta Horticulturae (ISHS)* **359**: 17–25
- HARTMANN, W., 1997: Strategy for breeding sharka resistant plums. *Acta Horticulturae (ISHS)* **478**: 31–38
- HARTMANN, W., 2001: Die Bedeutung der Hypersensibilität für die Züchtung scharkaresistenter Pflaumen und Zwetschen. *Erwerbsobstbau* **43**: 125–130
- HARTMANN, W., 2002: The importance of hypersensitivity for breeding plums and prunes re-

- sistant to plum pox virus (Sharka). *Acta Horticulturae* (ISHS) 577: 33–37
- HARTMANN, WALTER, 2005: Über die Empfindlichkeit einiger Hohenheimer Zuchtklone der Europäischen Pflaume gegenüber dem Scharakavirus. Mündliche Mitteilung am 21.02.2005
- HARTMANN, W. und PETRUSCHKE, M., 2000: Sharka resistant plums and prunes by utilization of hypersensitivity. *Acta Horticulturae* (ISHS) 538: 391–395
- HARTMANN, W. und PETRUSCHKE, M., 2002: Methods for testing the quantitative and qualitative resistance to plum pox virus (PPV). *Sana-teatea Plantelor (Rumänien) (Plant's Health, Special Edition)* 59: 4–11
- HAYES, A. J. und SAGHAI MAROOF, M. A. S., 2000: Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1279–1283
- HEATH, M. C., 2000: Hypersensitive response-realted death. *Plant Molecular Biology* 44: 321–334
- HEGI, G., 1906: *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Bd. IV, München (S. 1053 ff.)
- HEINKEL, R., HARTMANN, W. und STÖSSER, R., 2000: On the origin of the plum cultivars 'Cacaks beauty', 'Cacaks Best', 'Cacaks Early' and 'Cacaks Fruitful' as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA RAPD fragments. *Scientia Horticulturae* 83: 149–155
- HERMANN, W. und SCHULZ, L. C., 1981: Enzyme histochemical demonstration of certain cell populations in Synovium using plastic-embedded whole rat joints. In: DEICHES, H. und SCHULZ, L. C.: *Arthritis: Models and Mechanisms*. Springer Verlag, Berlin, 137–143
- HÉRNANDEZ, J. A., FERRER, M. A., JIMÉNEZ, A., BARCELÓ, A. R. und SEVILLA, F., 2001: Antioxidant systems and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* 127: 817–831
- HILY, J. M., SCORZA, R., MALINOWSKI, T., ZAWADZKA, B. und RAVELONANDRO, M., 2004: Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Research* 13: 427–436
- HOFFMANN, T., SCHIEDER, O. und WILLMITZER, L., 1997: Biotechnologische Verfahren zur Schaffung neuartiger genetischer Variabilität. In: ODENBACH, W. (Hrsg.): *Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 251–323
- HÖHN, H., SIEGFRIED, W., RÜEGG, J., HOLLIGER, E., STADLER, W., GUT, D. und NEUWEILER, R., 2005: Pflanzenschutzempfehlungen für den Erwerbsobstbau 2005. Flugschrift Nr. 122 der Agroscope FAW Wädenswil, Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau 141: 1–56
- HÜCKELHOVEN, R. FODOR, J., TRUJILLO, M. und KOGEL, K.-H., 2000: Barley *Mla* and *Rar* mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. *Planta* 212: 16–24
- HULL, R., 2002: *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, London, 4. Aufl., S. 411 ff.
- HURTADO, M. A., VILANOVA, S., ROMERO, C., ABBOTT, A. G., LLÁCER, G. und BADENES, M. L., 2002: Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) based on molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 182–191
- ION-NAGY, L., EYQUARD, J. P., LEGALL, O., DECROOQ, V., HERNOULD, M. und BRU, J. P., 2004a: In situ localization of Plum pox particles in susceptible and resistant apricot cultivars. *Acta Horticulturae* (ISHS) 657: 301–304
- ION-NAGY, L., LANCAC, M., HERNOULD, M., LEGALL, O., EYQUARD, J. P., SCHURDI-LEVRAUD, V. und DECROOQ, V., 2004b: *In situ* detection of the Plum pox virus in different *Prunus armeniaca* genotypes. European Meeting 2004 on Plum Pox, Rógow (Polen), 01.–04.09.2004, Book of Abstracts, 22
- JABS, T., 1999: Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants

- and animals. *Biochemical Pharmacology* **57**: 231–245
- JABS, T. und SLUSARENKO, A. J., 2000: The hypersensitive response. In: SLUSARENKO, A. J., FRASER, R. S. S. und VAN LOON, L. C. (Hrsg.): *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 279–323
- JAMES, D. und VARGA, A., 2004: Preliminary molecular characterization of *Plum pox potyvirus* isolate W3174: Evidence of a new strain. *Acta Horticulturae (ISHS)* **657**: 177–182
- JAMES, D., VARGA, A., THOMPSON, D. und HAYES, S., 2003: Detection of a new and unusual isolate of *Plum pox virus* in Plum (*Prunus domestica*). *Plant Disease* **87**: 1119–1124
- JARAUSCH, W., BASSLER, N., MOLLA, N. und KRCZAL, G., 2004: First detection and molecular characterisation of PPV-M strain in plum orchards in south-western Germany. *Acta Horticulturae (ISHS)* **657**: 159–164
- JEFFREE, C. E. und YEOMAN, M. M., 1983: Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. *New Phytologist* **93**: 491–509
- JOHANNSON, J. und OLDÉN, E. J., 1962: Zwetschen, Pflaumen, Reineclauden, Mirabellen. In: KAPPERT, H. und RUDORF, W. (Hrsg.): *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, Bd. 6: Züchtung von Gemüse, Obst, Reben und Forstpflanzen. Paul Parey Verlag, Berlin, 602–624
- JORDIVIC, M., 1968: Effect of sources of infection on epidemiology of sharka (plum pox) virus disease. *Tagungsbericht der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR* **97**: 301–308
- KALASHYAN, Y. A., BILKEY, T. D., VERDEREVSKAYA, T. D. und RUBINA, E. V., 1994: Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldava. *EPPO Bulletin* **24**: 645–649
- KARNOVSKY, M. J., 1965: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A
- KASSANIS, B. und SUTIC, D., 1965: Some results of recent investigations on sharka (plum pox) virus disease. *Zast. Bilja* **16**: 335–340
- KEGLER, H., 1990: Resistenz gegen das Scharka-Virus (plum pox virus). *Archiv für Gartenbau* **38**: 499–517
- KEGLER, H., 1992: Die Viruskonzentration als Merkmal der quantitativen Virusresistenz der Pflanzen. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **28**: 3–21
- KEGLER, H. und HARTMANN, W., 1993: Pflaume (*Prunus domestica*). In: KEGLER, H. und FRIEDT, W. (Hrsg.): *Resistenz von Kulturpflanzen gegen pflanzenpathogene Viren*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 380–382
- KEGLER, H. und HARTMANN, W., 1998: Present status of controlling conventional strains of Plum pox virus. In: HADIDI, A., KHETARPAL, R. K. und KOGANEZAWA, H. (Hrsg.): *Plant Virus Disease Control*. ASP Press, St. Paul (Minnesota), 616–628
- KEGLER, H., BAUER, E., VERDEREVSKAJA, T. D. und GRÜNTZIG, M., 1983: Zur Resistenz von Pflaumen gegenüber dem Scharka-Virus (plum pox virus). *Tagungsbericht der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR* **216**: 347–351
- KEGLER, H., BAUER, E., GRÜNTZIG, M., FUCHS, E., VERDEREVSKAJA, T. D. und BIVOL, T. F., 1985: Nachweis unterschiedlicher Resistenztypen bei Pflaumen gegen das Scharka-Virus (plum pox virus). *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* **5**: 339–346
- KEGLER, H., FUCHS, E., GRÜNTZIG, M., LUTHER, M. und VERDEREVSKAJA, T. D., 1986: Different types of resistance to Plum pox in plums. *Acta Horticulturae (ISHS)* **193**: 201–206
- KEGLER, H., GRÜNTZIG, M. und SCHIMANSKY, H.-H., 1991: Zur Resistenz der Pflaumenhybride K4 und ihrer F₁-Nachkommen gegen das Scharka-Virus der Pflaume (plum pox virus). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)* **43**: 102–106
- KEGLER, H., KONTZOG, H.-G. und SPAAR, D., 1993: Charakterisierung der Virusresistenz. In: KEGLER, H. und FRIEDT, W. (Hrsg.): *Resi-*

- stanz von Kulturpflanzen gegen pflanzenpathogene Viren. Gustav Fischer Verlag, Jena, 55–155
- KEGLER, H., GRÜNTZIG, M. und FUCHS, E., 1994: A glasshouse test for detecting resistance of plum genotypes to plum pox virus. *Acta Horticulturae (ISHS)* 359: 152–158
- KEGLER, H., FUCHS, E., GRÜNTZIG, M. und SCHWARZ, S., 1998: Some results of 50 years of research on the resistance to Plum pox virus. *Acta virologica* 42: 200–215
- KEGLER, H., GRÜNTZIG, M., FUCHS, E., RANKOVIC, M. und EHRIG, F., 2001: Hypersensitivity of plum genotypes to plum pox virus. *Journal of Phytopathology* 149: 213–218
- KEGLER, H., RANCOVIC, M., FUCHS, E. und GRÜNTZIG, M., 2002: Epidemiological relevance of hypersensitive response of plum genotypes to plum pox virus. *Jugoslovensko Vocarstvo* 36: 101–106
- KEPPLER, L. D. und NOVACKY, A., 1986: Involvement of lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathology* 76: 104–108
- KLESSIG, D. F. und MALAMY, J., 1994: The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1439–1458
- KLUGE, S., 1995: Virus- und viroidbedingte Schäden. In: HOCK, B. und ELSTNER, E. F. (Hrsg.): *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 373–383
- KOBORI, T., OHKI, S. T. und OSAKI, T., 2000: Movement of *Cucumber mosaic virus* is restricted at the interface between mesophyll and phloem pathway in *Cucumis figarei*. *Journal of General Plant Pathology* 66: 159–166
- KOLLMAN, R. und GLOCKMANN, C., 1991: Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface. *Protoplasma* 165: 71–85
- KONIECZNY, A. und AUSUBEL, F. M., 1993: A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4: 403–410
- KORTE, A.-M., MAISS, E., KRAMER, I. und CASPER, R., 1994: Biosafety consideration of different plum pox potyvirus (PPV) genes used for transformation of plants. *Acta Horticulturae (ISHS)* 386: 280–284
- KRCZAL, G. und AVENARIUS, U., 1994: Detection and characterization of plum pox potyvirus isolates from southern Germany by polymerase chain reaction (PCR). *EPPO Bulletin* 24: 625–631
- KRCZAL, H. und KUNZE, L., 1972: Untersuchungen zur Übertragung des Scharkavirus durch Blattläuse. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* 144: 71–83
- KUNZE, L., 1981: Die Scharkkrankheit der Pflaumen und Zwetschen. *Obstbau* 6: 480–482
- KUNZE, L., 1986: Wege und Möglichkeiten zur Bekämpfung der Scharkkrankheit. *Obstbau* 11: 55–57
- KUNZE, L. und KRCZAL, H., 1971: Transmission of sharka virus by aphids. *Ann. Phytopath. (hors série)*: 255–260
- LACKIE, P. M., 1996: Immunogold silver staining for light microscopy. *Histochemistry and Cell Biology* 106: 9–17
- LAHMATOVA, I. T., VERDEREVSKAJA, T. D., ZEMTCHIK, E. Z. und JURAVEL, A. M., 1998: Inheritance of Plum pox virus resistance in plum hybrids. *Acta Horticulturae (ISHS)* 472: 441–445
- LAIMER DA CÂMARA MACHADO, M., DA CÂMARA MACHADO, A., HANZER, V., WEISS, H., REGNER, F., STEINKELLNER, H., MATTANOVICH, D., PLAIL, R., KNAPP, E., KALTHOFF, B. und KATINGER, H., 1992: Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of plum pox virus. *Plant Cell Reports* 11: 25–29
- LAÍN, S., RIECHMANN, J. L. und GARCÍA, J. A., 1989: The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* 13: 157–172
- LANSAC, M., EYQUARD, J. P., LEGALL, O., DECROOCQ, V., SCHURDI-LEVRAUD, V. und GARCÍA, J. A., 2004: The use of green fluorescent

- protein-tagged recombinant *Plum pox virus* (PPV) to study viral invasion in *PPV/Prunus* interaction. *Acta Horticulturae* (ISHS) **657**: 335–340
- LECOQ, H., RAVELONANDRO, M., WIPF-SCHEIBEL, C., MONSION, M., RACCAH, B. und DUNEZ, J., 1994: Significance of the heterologous encapsidation of zucchini yellow mosaik potyvirus in transgenic plants expressing plum pox potyvirus capsid protein. *EPPPO Bulletin* **24**: 555–559
- LEFORT, F. und DOUGLAS, G. C., 1999: An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science* **56**: 259–263
- LEVINE, A., 2004: Programmed cell death in plant response to biotic stress (pathogen attack). In: GRAY, J. (Hrsg.): *Programmed Cell death in Plants*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 213–250
- LINNERT, G. und ODENBACH, W., 1997: Genomkartierung mit molekularen Markern. In: ODENBACH, W. (Hrsg.): *Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 324–346
- LÓPEZ-MOYA, J. J. und GARCIA, J. A., 1999: Potyviruses (Potyviridae). In: WEBSTER, R. G. und GRANOFF, A. (Hrsg.): *Encyclopedia of Virology*. Academic Press, London, 2. Aufl., Bd. 3, 1369–1375
- LÓPEZ-MOYA, J. J., CANTO, T., DIAZ-RUIZ, J. R. und LÓPEZ-ABELLA, D., 1995: Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. *Journal of General Virology* **76**: 2293–2297
- LÓPEZ-MOYA, J. J., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R., CAMBRA, M. und GARCÍA, J. A., 2000: Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* **76**: 121–136
- MAISS, E., TIMPE, U., BRISKE, A., JELKMANN, W., CASPER, R., HIMMLER, G., MATTANOVICH, D. und KATINGER, H. W. D., 1989: The complete nucleotide sequence of Plum pox virus RNA. *Journal of General Virology* **70**: 513–524
- MAISS, E., VARRELMANN, M., DI FONZO, C. und RACCAH, B., 1997: Risk assessment of transgenic plants expressing the coat protein gene of plum pox potyvirus (PPV). In: TEPPER, M. und BALÁZS, E. (Hrsg.): *Viral-resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*. INRA und Springer-Verlag, Versailles und Heidelberg, 85–93
- MALINOWSKI, T., ZAWADZKA, B., RAVELONANDRO, M. und SCORZA, R., 1998: Preliminary report on the apparent breaking of resistance of a transgenic plum by chip bud inoculation of plum pox virus PPV-S. *Acta Virologica* **42**: 241–243
- MALINOWSKI, T., ZAWADZKA, B., RAVELONANDRO, M. und SCORZA, R., 2004: Durable resistance of transgenic plum (*Prunus domestica*) to Plum pox virus – is long term field trial a waste of time? European Meeting 2004 on Plum Pox, Rógow (Polen), 01.–04.09.2004, Book of Abstracts, 32
- MALUSA, E. und MARCHESINI, A., 1993: A new method to study genetic variation of vegetals for breeding purposes. Note I : Study on *Prunus*. *Fitoterapia* **64**: 427–432
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., AUDERGON, J. M. und DICENTA, F., 2000: Efficiency of inoculation of peach GF305 seedlings with *Plum pox virus* by different methods. *Acta Virologica* **44**: 329–333
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., RUBIO, M., DICENTA, F. und GRADZIEL, T.M., 2004: Utilization of almond as source of *Plum pox virus* resistance in peach breeding. *Acta Horticulturae* (ISHS) **657**: 289–293
- MASSALA, R., LEGRANDE, M. und FRITIG, B., 1980: Effect of α -amioacetate, a competitive inhibitor of phenylalanin ammonia lyase, on the hypersensitive resistance of tobacco to tobacco mosaic virus. *Physiological Plant Pathology* **16**: 213–226
- MEKSEM, K., RUBEN, E., HYTEN, D., TRIWITAYAKORN, K. und LIGHTFOOT, D. A., 2001: Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Molecular Genetics and Genomics* **265**: 207–214

- MELCHINGER, A. E., 1990: Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* **104**: 1–19
- MICHELMORE, R. W., PARAN, I. und KESSELI, R. V., 1991: Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 9828–9832
- MINEV, I. und DRAGOISKI, K., 1995: Interspecific hybrids of genus *Prunus* with a high field resistance to Plum pox virus. *Plant Science (Sofia, Bulgarien)* **32**: 42–43
- MINOIU, N., 1994: Recent results on resistance to plum pox potyvirus in plum in Romania, and on the epidemiology of the disease. *EPP0 Bulletin* **24**: 775–780
- MINOIU, N., 1997: Bolile si daunatorii prunului. In: COCIU, V., BOTU, I., MINOIU, N., PASC, I. und MODORAN, I. (Hrsg.): *Prunul*. Editura Conphys (Rumänien), 343–420
- MUELLER, U. G. und WOLFENBARGER, L. L., 1999: AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 389–394
- MYRTA, A., BOSCIA, D., GAVRIEL, I., GATT, M., VARVERI, CH., DI TERLIZZI, B., ÇAGLAYAN, K., GHANEM, G. A., KHOURI, W. und SAVINO, V., 1998: Detection and serotyping of plum pox virus (PPV) isolates by monoclonal antibodies. In: DI TERLIZZI, B., MYRTA, A. und SAVINO, V. (Hrsg.): *Stone Fruit Viruses and Certification in the Mediterranean Countries: Problems and Prospects*. *Options Méditerranéennes, série B, Nr. 19*, 211–215
- NAVRATIL, M. und SAFAROVA, D., 2005: First incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China. *Plant Disease* **89**: 338
- NEFF, M. M., NEFF, J. D., CHORY, J. und PEPPER, A. E., 1998: dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal* **14**: 387–392
- NEFF, M. M., TURK, E. und KALISHMAN, M., 2002: Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends in Genetics* **18**: 613–615
- NEGI, M. S., DEVIC, M., DELSENY, M. und LAKSHMIKUMARAN, M., 2000: Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 146–152
- NÉMETH, M., 1986: *Virus, mycoplasma and rik-kettsia diseases of fruit trees*. Martinus Nijhoff Publishers und Akadémiai Kiadó, Budapest, 463–479
- NÉMETH, M., 1994: History and importance of plum pox in stone-fruit production. *EPP0 Bulletin* **24**: 525–536
- OKIE, W. R. und WEINBERGER, J. H., 1996: Plums. In: JANICK, J. und MOORE, J. N. (Hrsg.): *Fruit Breeding. Volume I: Tree and Tropical Fruits*. John Wiley & Sons, New York, 559–607
- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. und HAYASHI, K., 1989: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874–879
- PARAN, I. und MICHELMORE, R. W., 1993: Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* **85**: 985–993
- PETRI, C. und BURGOS, L., 2005: Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? *Transgenic Research* **14**: 15–26
- PETRUSCHKE, MICHAEL, 2005: Ergebnisse der Schakarkaresistenztests der Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart in Breisach und Weil der Stadt. Mündliche Mitteilung am 22.02.2005
- PETRUSCHKE, M. und SCHRÖDER, M., 1999: Scharka – Resistenzverhalten von neuen Hohenheimer Zwetschenkreuzungen. *Obstbau* **24**: 166–169

- PFITZNER, U. M. und PFITZNER, A. J., 1992: Expression of a viral avirulence gene in transgenic plants is sufficient to induce the hypersensitive defence reaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 318–321
- PIELKA, J., LUCKA, M. und KROPP, K., 1971: The problem of propagation of sharka virus in the South of Poland. *Annales de Phytopathologie, Hors Série (INRA, Paris)*: 245–248
- RANKOVIC, M. und DULIC-MARKOVIC, I., 1992: Evaluation of *Prunus spinosa* L. as host of Sharka and other viruses. *Acta Horticulturae (ISHS)* **309**: 151–155
- RANKOVIC, M., PAUNOVIC, S. und DULIC-MARKOVIC, I., 1995: Current situation and future trends in solving Sharka problem in FR Yugoslavia. *Acta Horticulturae (ISHS)* **386**: 241–246
- RAVELONANDRO, M., PEYRUCHAUD, O., GARRIGUE, L., DE MARCILLAC, G. und DUNEZ, J., 1993: Immunodetection of the plum pox virus helper component in infected plants and expression of its gene in transgenic plants. *Archives of Virology* **130**: 251–268
- RAVELONANDRO, M., DUNEZ, J. und SCORZA, J., 1998: Characterization of phenotype resistance to plum pox of transgenic plums expressing plum pox virus capsid gene. *Acta Virologica* **42**: 270–272
- REBENSTORF, K. und BÜTTNER, C., 2004: Eine kleine Studie zum Auftreten des Sharka-Virus (Plum pox potyvirus) in Pflaumenobstbeständen im Berliner Umland. *Gesunde Pflanzen* **56**: 27–31
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., 2002: How to write the names of virus species. In: KHAN, J. A. und DIJKSTRA, J. (Hrsg.): *Plant Viruses as Molecular Pathogens*. Food Products Press (imprint of The Haworth Press), New York, 25–27
- RIECHMANN, J. L., LAÍN, S. und GARCÍA, J. A., 1989: The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* **70**: 2785–2789
- RIECHMANN, J. L., LAÍN, S. und GARCÍA, J. A., 1991: Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA. *Virology* **185**: 544–552
- RIEDEL, D., LESEMANN, D.-E. und MAIß, E., 1998: Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. *Archives of Virology* **143**: 2133–2158
- RIEHL, THOMAS, 2005: Über die Verbreitung der Scharkavirose in Franken. Mündliche Mitteilung am 10.02.2005
- RÖDER, K., 1939: Sortenkundliche Untersuchungen an *Prunus domestica*. *Kühn-Archiv, Bd. 54, Halle (Saale)* (S. 4f.)
- ROTH, B., 2004: Induktion von programmiertem Zelltod in *Nicotiana tabacum* L. durch virale oder humane Bcl-2 Proteine und Identifizierung pflanzlicher Interaktionsproteine. Dissertation Universität Hohenheim. Verlag Martin Meidenbauer, München
- ROY, A. S. und SMITH, I. M., 1994: Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin* **24**: 515–523
- RUDELLE, C. L., 1967a: Hydroxyethyl methacrylate combined with polyethylene glycol 400 and water; an embedding medium for routine 1–2 micron sectioning. *Stain Technology* **42**: 119–123
- RUDELLE, C. L., 1967b: Embedding medium for 1–2 micron sectioning. 2. Hydroxyethyl methacrylate combined with 2-butoxyethanol. *Stain Technology* **42**: 253–255
- RÜHL, K., 1994: Resistenzformen bei der Scharkkrankheit. *Mitteilungen Klosterneuburg* **44**: 108–109
- RYBIN, W. A., 1936: Spontane und experimentell erzeugte Bastarde zwischen Schwarzdorn und Kirschlordele und das Abstammungsproblem der Kulturpflaume. *Planta* **25**: 22–58
- SÁENZ, P., CERVERA, M. T., DALLOT, S., QUIOT, L., QUIOT, J.-B., RIECHMANN, J. L. und GARCÍA, J. A., 2000: Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K₁. *Journal of General Virology* **81**: 557–566.

- SÁENZ, P., SALVADOR, B., SIMÓN-MATEO, C., KASSCHAU, K. D., CARRINGTON, J. C. und GARCÍA, J. A., 2002: Host-specific involvement of the HC Protein in the long-distance movement of Potyviruses. *Journal of Virology* **76**: 1922–1931
- SALAVA, A., KRŠKA, B., WANG, E., POLAK, J., KOMINEK, P., REIGHARD, G., MILLER, W., DOWLER, W. und ABBOTT, A. G., 2002: Bulk segregant analysis and construction¹ of a linkage map in apricot (*Prunus armeniaca* L.) crosses segregating for resistance to Plum pox virus. *Plant, Animal and Microbe Genomes, Xth Conference*, San Diego, California, 12.–16.01.2002
- SALESSES, G. und BONNET, A., 1994: Cytological studies of tetra- and octoploid interspecific hybrids between *P. cerasifera*, *P. spinosa* and *P. domestica*. *Acta Horticulturae (ISHS)* **359**: 26–32
- SCHMIDT, M., 1954: Beiträge zur Züchtungsforschung bei Pflaumen. *Züchter* **24**: 157–161
- SCHRAUDNER, M., MOEDER, W., WIESE, C., VAN CAMP, W., INZÉ, D., LANGEBARTELS, CH. und SANDERMANN, H., 1998: Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal* **16**: 235–245.
- SCHUCH, K., 1957: Viruskrankheiten und ähnliche Erscheinungen bei Obstgewächsen. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* **97**: 77–80
- SCORZA, R., RAVELONANDRO, M., CALLAHAN, A. M., CORDTS, J. M., FUCHS, M., DUNEZ, J. und GONSALVES, D., 1994: Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Reports* **14**: 18–22
- SHAN, X., BLAKE, T. K. und TALBERT, L. E., 1999: Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **98**: 1072–1078
- SHUKLA, D. D., WARD, C. W. und BRUNT, A. A., 1994: *The Potyviridae*. CAB International, Wallingford (S. 74–112)
- SLAYMAKER, D. H., NAVARRE, D. A., CLARK, D., DEL POZO, O., MARTIN, G. B. und KLESSIG, D. F., 2002: The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **99**: 11640–11645
- SMITH, S. und HULBERT, S., 2005: Evolution of disease resistance genes. In: TSUYUMU, S., LEACH, J. E., SHIRAISHI, T. und WOLPERT, T. (Hrsg.): *Genomic and Genetic Analysis of Plant Parasitism and Defence*. The American Phytopathological Society, 137–149
- SRINIVASAN, C., PADILLA, I. M. G. und SCORZA, R., 2005: *Prunus* ssp. almond, apricot, cherry, nectarine, peach and plum. In: LITZ, R. E. (Hrsg.): *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI Publishing, Wallingford (UK), 512–542
- STAKMANN, E. C., 1915: Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research* **4**: 193–199
- STEINBISS, H.-H., 1993: Gentechnik zur Erzeugung von Virusresistenz. In: KEGLER, H. und FRIEDT, W. (Hrsg.): *Resistenz von Kulturpflanzen gegen pflanzenpathogene Viren*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 214–231
- STRASBURGER, E. (Begründer), 1991: *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 33. Aufl. (S. 474)
- SULZINSKI, M. A. und ZAITLIN, M., 1982: *Tobacco mosaic virus* replication in resistant and susceptible plants: in some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. *Virology* **121**: 12–19
- SUTIC, D. und RANKOCIV, M., 1981: Resistance of some plum cultivars and individual trees to

1 Im tatsächlichen Titel lautet das Wort „constuction“, wobei es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Druckfehler handelt.

- Plum Pox (Sharka) virus. *Agronomie* **1**: 617–622
- SZIRMAI, J., 1961: Report on fruit tree virus diseases in Hungary. *Tidsskrift for Planteavl* **65**: 220–229
- TEYCHENEY, P. Y., TAVERT, G., DELBOS, R., RAVELONANDRO, M. und DUNEZ, J., 1989: The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucleic Acid Research* **17**, 10115f.
- THEILER, R., 1971: Embryonenkultur für die Anzucht neuer Kirschenhybriden (*Prunus avium* L.). *Schweiz. Landwirt. Forsch.* **10**: 65–93
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Z. und COLLINGE, D. B., 1997: Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**: 1187–1194
- TRIFONOV, D., 1978: Susceptibility of *Prunus* infestita to Sharka virus and to Polystigma leaf blight. *Acta Horticulturae (ISHS)* **74**: 229–232
- VACLAV, V., 1960: Ispitivanje sarke sljive (Investigations of sharka disease). Sarajewo (S. 199–206)
- VANACKER, H., CARVER, T. L. W. und FOYER, Ch. H., 2000: Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* **123**: 1289–1300
- VANDERPLANK, J. E., 1984: Disease Resistance in Plants. Academic Press, London, 2. Auflage
- VANEK, G., KOTUC, J., NÉMETH, M., KÖLBER, M. und SZÖKE, L., 1992: Study of the ecological factors influencing attacks by Plum pox virus. *Acta Horticulturae (ISHS)* **309**: 143–149
- VILANOVA, S., ROMERO, C., ABBOTT, A. G., LLÁCER, G. und BADENES, M. L., 2003: An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theoretical and Applied Genetics* **107**: 239–247
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. und ZABEAU, M., 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407–4414
- WATERHOUSE, P. M., SMITH, N. A. und WANG, M.-B., 1999: Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends in Plant Science* **4**: 452–457
- WEBER, H. und PFITZNER, A.J., 1998: *Tm-2²* resistance in tomato requires recognition of the carboxy terminus of the movement protein of tomato mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 498–503
- WEBER, H., OHNESORGE, S., SILBER, M. V. und PFITZNER, A. J. P., 2004: The *Tomato mosaic virus* 30kDa movement protein interacts differentially with the resistance genes *Tm-2* and *Tm-2²*. *Archives of Virology* **149**: 1499–1514
- WETZEL, T., CANDRESSE, T., MACQUAIRE, G., RAVELONANDRO, M. und DUNEZ, J., 1992: A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* **39**: 27–37
- WOJTASEK, P., 1997: Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**: 681–692
- WOLFE, M. S. und GESSLER, C., 1992: The use of resistance genes in breeding. Epidemiological considerations. In: BOLLER, T. und MEINS, F.: *Genes Involved in Plant Defence*. Springer Verlag, Wien, 3–23
- YEOMAN, A. F. und BROWN, R., 1976: Implications of the formation of the graft union for organization in the intact plant. *Annals of Botany* **40**: 1265–1276
- ZAMBRYSKI, P. und CRAWFORD, K., 2000: Plasmodesmata: Gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 393–421
- ZAWADZKA, B., 1965: Observations an preliminary experiments on fruit tree virus diseases in Poland. *Zastita Bilja* **16**: 513–516

ZAWADZKA, B., 1980: The response of several plum cultivars to infection with plum pox virus. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **15**: 215–221

ZHANG, Y., SIMEONE, A. M., und CAPPELLINI, P., 2000: Modificazioni fisiologiche determinate dal virus sharka del susino nelle foglie di pesco e di albiciocco (*Prunus persica* Stock. - *Prunus armeniaca* L.). *Phytopathologia Mediterranea* **39**: 447–450

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.2–1	Jährlich produzierte Menge an Europäischer Pflaume in den Ländern der EU im Durchschnitt der Jahre 2001 bis 2004 (FAOSTAT 2004).	3
Tab. 1.4–1	Frucht- und Blatttoleranz ausgewählter Sorten der Europäischen Pflaume gegenüber PPV	27
Tab. 2.1–1	Auf Hypersensibilität untersuchte Kreuzungsnachkommenschaften mit der jeweiligen Anzahl der getesteten Hybriden.	42
Tab. 2.1–2	Bonitierte Merkmale und deren Ausprägungsformen	44
Tab. 2.1–3	Zuordnung von Genotypen der Europäischen Pflaume zu Hypersensibilitätsklassen (HK) in Abhängigkeit vom Hypersensibilitätsindex (HI)	54
Tab. 2.1–4	Hypersensibilitätsindices (HI) und Hypersensibilitätsklassen (HK) ausgewählter Genotypen.	54
Tab. 2.2–1	Vergleich der Testsysteme „Doppelpfropfung im Gewächshaus“ und „Veredlung auf scharkabefallene Bäume im Freiland“	55
Tab. 2.2–2	Reaktion der Sorte ‘Jojo’ auf Inokulation mit verschiedenen Scharkavirusisolaten mittels chip budding	59
Tab. 2.2–3	Einfluss des PPV-Stammes auf die Hypersensibilitätsindices und -klassen verschiedener Nachkommen aus Kreuzungen mit den hypersensiblen Genotypen ‘Jojo’ und ‘Ort×Stan 34’ als Elternteil.	61
Tab. 3.1–1	Reaktion verschiedener Genotypen auf Inokulation mit PPV-D und PPV-M durch chip budding.	65
Tab. 3.2–1	Auf Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies in der Blattspreite getestete Genotypen und ihre Reaktion nach PPV-Inokulation durch Doppelpfropfung.	73
Tab. 3.2–2	Für die SA-Bestimmung verwendete Genotypen und ihre Reaktion auf PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung	77
Tab. 3.3–1	Für den PPV-Nachweis verwendete Genotypen und ihre Reaktion auf PPV-Inokulation mittels Doppelpfropfung	82
Tab. 4.2–1	Anzahl der getesteten Hybriden, prozentuale Verteilung der Genotypen verschiedener Hypersensibilitätsklassen (HK) und prozentualer Anteil der Genotypen mit PPV-Symptomen auf der Blattspreite in den einzelnen Nachkommenschaften.	91

Tab. 4.2–2	Paarweiser Vergleich der Hypersensibilitätsindices verschiedener Kreuzungskombinationen.	95
Tab. 4.2–3	Als Elternsorten verwendete hypersensible Genotypen und deren Abstammung	96
Tab. 4.2–4	Anteil hypersensibler Genotypen in den Nachkommenschaften von Kreuzungskombinationen mit zwei hypersensiblen Elternteilen (Auszug aus Tab. 4.2–1).	98
Tab. 5.2–1	Bedingungen für die PCR 1	108
Tab. 5.2–2	Bedingungen für die PCR 2	109
Tab. 5.2–3	Beispiel für Sequenzen der Fragmente, die Polymorphismen zugrunde liegen	111
Tab. 5.2–4	Fragmente, die Polymorphismen im Bandenmuster bedingen.	111
Tab. 5.3–1	Für die Amplifizierung verschiedener AFLP-Fragmente verwendete Primer	113
Tab. 5.3–2	Bedingungen für die PCR	114
Tab. 5.3–3	Primerbindungsstellen (farbig markiert) bei den AFLP-Fragmenten Hyp 1, 22 und 16	115

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.3–1	Genomkarte des Plum pox virus	5
Abb. 1.3–2	Phylogenetische Analyse einiger PPV-Isolate, basierend auf den Genprodukten des für P3 und 6K ₁ codierenden Genomabschnittes	7
Abb. 1.3–3	Phylogenetischer Baum verschiedener PPV-Isolate basierend auf der Nukleotidsequenz der hypervariablen N-terminalen Region des Hüllproteins	7
Abb. 1.3–4	PPV-Blattsymptome	10
Abb. 1.3–5	PPV-Fruchtsymptome.	11
Abb. 1.3–6	Auswirkungen der Scharkavirose auf einjährige Triebe (Bruchtest)	12
Abb. 1.3–7	Auswirkungen von Scharkabefall auf wichtige Parameter einer Steinobstanlage	13
Abb. 1.3–8	Weltweite Verbreitung des Scharkavirus	15
Abb. 1.3–9	Begriffe zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen Pflanzen und phytopathogenen Viren	19
Abb. 1.4–1	Ansatzpunkte pflanzlicher Resistenzmechanismen im schematisch dargestellten Zyklus viraler Infektion und Multiplikation.	21
Abb. 1.4–2	Scharkasymptome auf Blättern des transformierten Klons 'C5', der das Hüllproteingen des Plum pox virus trägt.	30
Abb. 1.5–1	Schematische Darstellung des vermuteten Ablaufs der HR und beteiligter Regelmechanismen	33

Abb. 1.5–2	Schematische Darstellung des N-Proteins, des Produkts eines R-Gens des Tabaks, das eine HR gegen TMV bedingt	35
Abb. 1.5–3	Komplexität der Signal- und Stoffwechselwege, die an der Pathogenerkennung und -abwehr durch HR beteiligt sind.	36
Abb. 2.1–1	Entwicklung der Triebspitzendürre bei hypersensiblen Genotypen nach Doppelpfropfung mit PPV-infizierter Zwischenveredlung	46
Abb. 2.1–2	Besonderheiten bei der Entwicklung der Triebspitzendürre hypersensibler Genotypen nach Doppelpfropfung mit PPV-infizierter Zwischenveredlung	47
Abb. 2.1–3	Ausprägungsformen von Rindennekrosen.	48
Abb. 2.1–4	Querschnitt durch einen Spross mit Rindennekrosen ('Hoh 7355')	49
Abb. 2.1–5	Beispiele für schwache Blattspaltennekrosen (Boniturstufe 1)	50
Abb. 2.1–6	Ausprägungsformen der Blattspaltennekrosen.	51
Abb. 2.1–7	Veränderungen im Wuchsverhalten	52
Abb. 2.1–8	Merkmale der Hypersensibilität in Gegenüberstellung zur Sensibilität (Empfindlichkeit) gegenüber PPV	53
Abb. 2.2–1	Spezielle Aspekte der Triebspitzendürre als Reaktion auf PPV-Infektion	57
Abb. 2.2–2	Reaktionen der Sorte 'Jojo' auf Inokulation mit verschiedenen PPV-Isolaten mittels chip budding	60
Abb. 3.1–1	Histologische Schnitte durch die Veredlungsstelle (Chip der Sorte 'Hanita', infiziert mit PPV-D, auf 'Jojo'), sechs Wochen nach der Veredlung	64
Abb. 3.1–2	Histologische Schnitte durch die Veredlungsstelle (Rindenspan der Sorte 'Hanita' auf 'Jojo'). ACN-Färbung	66
Abb. 3.2–1	Nachweis von Superoxidanionen mit NBT in der Blattspalte der Sorten 'Jojo' und 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' nach künstlicher Inokulation mit PPV	70
Abb. 3.2–2	Semidünnschnitt durch die Blattspalte von 'Jojo' nach dem Nachweis von Superoxidanionen	71
Abb. 3.2–3	Nachweis von ROS in virusinfizierten Blättern verschiedener Genotypen mit DAB und NBT	74
Abb. 3.2–4	Histologischer Nachweis von $O_2^{\cdot -}$ mit NBT in Schnitten durch die Blattspalte hypersensibler Genotypen.	75
Abb. 3.2–5	Semidünnschnitte durch mit DAB behandelte Blattspalten von Bäumen des Zuchtklons 'Hoh 7558'.	75
Abb. 3.2–6	HPLC-Chromatogramm. Detektion von Salicylat bei einer Retentionszeit von 9 min 54 sec.	78
Abb. 3.2–7	Salicylat-Gehalte in den Blattspalten der einzelnen Genotypen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Probenahme	79
Abb. 3.3–1	Nachweis des PPV-Hüllproteins in der Blattspalte der Sorte 'Hauszwetsche, Typ Schüfer' mit IGSS	83

Abb. 3.3–2	Nachweis des PPV-Hüllproteins in der Blattspreite verschiedener Genotypen mit IGSS.	84
Abb. 3.3–3	Nachweis von PPV-GFP (grüne Fluoreszenz) in der Blattspreite verschiedener Genotypen im Stereomikroskop unter Fluoreszenzlicht.	86
Abb. 3.3–4	Nachweis der Verbreitung von PPV-GFP in der Blattspreite von Genotypen der Europäischen Pflaume	87
Abb. 4.2–1	Anteil der Genotypen in den Nachkommenschaften verschiedener Kreuzungskombinationen nach Hypersensibilitätsklassen	92
Abb. 4.2–2	Hypersensibilitätsindex. Häufigkeit in der Gesamtheit der untersuchten Hybriden und in zwei exemplarisch ausgewählten Kreuzungsnachkommenschaften	93
Abb. 4.2–3	Differenz der Summe der prozentualen Anteile der HK 1, 2 und 3 mit dem prozentualen Anteil der HK 0	93
Abb. 4.2–4	Dotplot des HI der Kreuzungskombinationen ‘Fellenberg’×‘Jojo’ und ‘Hanita’×‘Jojo’und ihrer reziproken Kreuzungen.	94
Abb. 4.2–5	Dotplot des HI der Kreuzungskombinationen ‘Ort×Stan 34’×‘Hanita’ und ‘Jojo’×‘Hanita’	96
Abb. 4.2–6	Anteil der Genotypen mit HK 2 und 3 in den Nachkommenschaften der untersuchten Kreuzungskombinationen (I)	97
Abb. 4.2–7	Anteil der Genotypen mit HK 2 und 3 in den Nachkommenschaften der untersuchten Kreuzungskombinationen (II).	99
Abb. 5.2–1	In der PCR 2 verwendete Primerkombinationen	109
Abb. 5.2–2	Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel	110
Abb. 5.2–3	Ausschnitt aus Polyacrylamidgelen mit Polymorphismen im Bandenmuster.	111
Abb. 5.3–1	PCR-Produkte verschiedener Primerkombinationen	114
Abb. 5.3–2	Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit verschiedenen Enzymen.	116
Abb. 5.3–3	Trennung der PCR-Produkte Hyp 22 und Hyp 1 mittels der SSCP-Methode.	117
Abb. 5.3–4	Vergleich der Sequenzen der Allele der Sorten ‘Felsina’ und ‘Jojo’	118
Abb. 5.3–5	Generierung von Primersequenzen für die dCAPS-Analyse am Beispiel der Sequenzen F12 (wild type) und J10 (mutant) mit dem Programm dCAPS Finder 2.0	120

Danksagung

Meinem inzwischen verstorbenen Doktorvater, Herrn Prof. **Rudolf Stösser**, sei mein Dank dafür ausgesprochen, dass er mich trotz seines bevorstehenden Ausscheidens aus dem aktiven Berufsleben als Doktorand angenommen und mich in allen Belangen in Zusammenhang mit meinem Promotionsprojekt gefördert und unterstützt hat. Seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. **Jens Wünsche**, danke ich dafür, dass er mir sofort nach seinem Amtsantritt als neuer Doktorvater zur Verfügung stand und mir den zügigen, fachlich kompetent begleiteten Abschluss der Promotion ermöglichte. Herrn Prof. Dr. **Arthur Pfitzner** bin ich für die Übernahme des Coreferats ebenso dankbar wie für die Möglichkeit, die molekularbiologischen Untersuchungen in den Labors des Fachgebiets Allgemeine Virologie durchzuführen, und für die fachliche Begleitung, die Diskussionen und zahlreichen Anregungen, die das Promotionsvorhaben bereichert haben. Herrn Prof. **Michael Kruse** möchte ich dafür danken, dass er sich völlig unkompliziert als kompetenter dritter Prüfer im Kolloquium zur Verfügung gestellt hat.

Vielen Personen gilt mein Dank, die sich um den Fortgang der Arbeit in vielfältiger Weise verdient gemacht haben:

- Herrn **Michael Petruschke** von der Landesanstalt für Pflanzenschutz Stuttgart für die Erlaubnis, die insektensicheren Gewächshäuser der Landesanstalt für Untersuchungen mit verschiedenen Scharkavirusstämmen zu verwenden, für die Möglichkeit, die Bestände der Scharkaversuchsanlage Weil der Stadt zu nutzen, für seine zahlreichen Hilfestellungen und die vielen Diskussionen über den gesamten Bereich des Obstbaus, und seinem „frostresistenten“ Mitarbeiter **Thomas Letsch** sowie Frau **Dietlinde Rißler** für die Unterstützung beim PPV-Nachweis mittels ELISA- und PCR-Tests,
- den Herren **Erich Kiefer** und seinem Vater **Josef Kiefer** von der gleichnamigen Baumschule in Ortenberg (Baden) mit der gesamten Familie für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die Möglichkeit zum Reiserschnitt in den betriebseigenen Anlagen,
- Herrn **Volker Kuhl** für seine tatkräftige Unterstützung beim Anfertigen der mikroskopischen Schnitte und seine Ideen zur Vereinfachung von Arbeitsabläufen, Herrn Dr. **S. F. Anvari** für die fundierte Einführung in die botanische Mikrotechnik und Herrn **Hartmut Dietle** für seine wertvollen Hinweise zur Mikroskopie, allen dreien für ihre stets zuvorkommende Hilfsbereitschaft,
- Herrn Dr. **Bernhard Roth** für die zahllosen Hinweise zu molekularbiologischen Techniken, seine Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Hinweise, Frau **Christine Arnold** und allen anderen **Mitarbeitern am Fachgebiet Virologie** des Instituts für Genetik für ihre gewährte Unterstützung bei den Laborarbeiten,
- Mme. Dr. **Véronique Decroocq** von der Abteilung „Interactions Plantes–Virus“ des Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Bordeaux Aquitaine für die Ermöglichung und fachliche

Begleitung des zweimonatigen Forschungsurlaubes in Bordeaux zur Durchführung der AFLP-Analysen und ihre wertvollen Hinweise, ihrem Ehemann, M. Dr. **Stéphane Decroocq**, für die Ermutigung und die Hilfestellungen bei der Etablierung der AFLP-Methode, Mme. **Ligia Ion-Nagy** für die Hinweise zur *In-Situ*-Hybridisierung und zum Immunogold-Silverstaining, Mme. **Micheline Lansac** für ihre Unterstützung bei der Untersuchung der Virusausbreitung mit Hilfe des Virusisolats PPV-GFP und bei der Erweiterung meiner Französischkenntnisse sowie Mme. Dr. **Valérie Schurdi-Levraud** für ihre Hinweise,

- dem Leiter der Versuchsstation für Gartenbau der Universität Hohenheim, Herrn **Rainer Bäßler**, für die wohlwollende Unterstützung bei der Anlage der ressourcenintensiven Versuche, Herrn **Thilo Schad und seinen Mitarbeitern** für die Hilfe beim Veredeln und bei der Pflege der Versuchspflanzen, Frau **Martina Schuster** und Herrn **Werner Pfitzer mit ihren Mitarbeitern** für die spartenübergreifende Zusammenarbeit, kollegiale Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung,
- Herrn Dr. **Frank Walker und seinen Mitarbeiterinnen** vom Institut für Phytomedizin für die Möglichkeit, die Salicylatbestimmung im Labor des Fachgebiets durchführen zu können, und ihre freundliche Unterstützung,
- allen **Mitarbeiter(inne)n, Doktorand(inn)en und Diplomand(inn)en des Instituts für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie** für das angenehme Arbeitsklima und die gewährte Hilfe, insbesondere Frau **Renate Binder** und Herrn Dr. **Nikolaus Merkt**,
- Frau Dr. **Sigrun Hechtl**, Frau **Angelika Kiening**, Frau **Andrea Riegel**, Frau **Manuela Bauer**, Herrn Dr. **Erich Hechtl**, Herrn **Christoph Hechtl**, Herrn Dr.

Bernhard Roth und **meiner Frau** für das Lektorieren des vorliegenden Textes.

Mein besonderer Dank gebührt dem Team um Dr. Walter Hartmann: Herr **Eckhart Fritz**, dem nicht nur pomologischen Multitalent, bin ich für die vielfältige Unterstützung beispielsweise in Belagen der Veredlungs- und EDV-Technik und seine offenen Umgangsformen zu Dank verpflichtet. Frau **Gisela Frey** sei für die von Anfang an offenherzige Aufnahme, ihre Korrektheit, unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie für ihre Sorge um mein leibliches wie geistiges Wohlergehen von Herzen gedankt. Herrn Dr. **Walter Hartmann** aber, dem genialen Züchter mit obstbaulichem Universalwissen, habe ich Möglichkeit an sich zu verdanken, die vorliegende Arbeit zu erstellen. Er hat mich stets an seinem reichen Erfahrungsschatz teilhaben lassen und mich mit unermüdlichem Einsatz gefördert. Seine Geradlinigkeit, sein Enthusiasmus und seine Verlässlichkeit haben mich geprägt. Einen besseren Betreuer hätte ich nicht finden können. Daher möchte ich ihm in besonderer Weise meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Alle Mitarbeiter des Obstbauteams sind mir in den knapp drei Jahren gemeinsamen Arbeitens zu guten Freunden geworden. Für all ihre Mühen und ihr Dasein richte ich an sie ein aufrichtiges „Vergelt's Gott!“.

Stütze war mir während der gesamten Zeit in Hohenheim **meine Ehefrau Maria**. Für sie war die Zeit meiner Promotion mit zahlreichen Entbehrungen verbunden. Für Ihre Aufopferung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt verdient sie meinen besonderen Dank. Auch meinen **Eltern** und **Schwiegereltern** bin ich zu großem Dank verpflichtet, nicht zuletzt für die Unterstützung bei der Aufrechterhaltung der heimischen Versuchsanlagen.

Dem **Cusanuswerk**, der Bischöflichen Studienförderung in Deutschland, sei für die Aufnahme in seine Graduiertenförderung gedankt, die mit der Gewährung eines finanziellen Stipendiums aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung und der Teilnahme am vielfältigen Bildungsprogramm verbunden war.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Michael Neumüller
geboren am 11. Januar 1977 in Freising
wohnhaft in Hallbergmoos
römisch-katholisch
deutscher Staatsbürger
verheiratet

Schulbildung und beruflicher Werdegang

1983–1987	Grundschule in Hallbergmoos
1987–1996	Dom-Gymnasium in Freising (neusprachlicher Zweig) Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/1996–10/1997	Zivildienst am Erzbischöflichen Jugendamt in München
11/1997–06/2002	Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München, Abschluss als Dipl.-Ing. agr. Univ.
09/2002–08/2005	Doktorand am Institut für Sonderkulturen und Produktionsphysiologie der Fakultät Agrar- wissenschaften der Universität Hohenheim, Stipendiat des Cusanuswerks

Auslandsaufenthalte und praktische Berufserfahrung

seit 1993	Betrieb einer Obstanlage in Hallbergmoos
1997–1998	Teilzeitbeschäftigung am Lehrstuhl für Obstbau der Technischen Universität München, Arbeiten im Gewebelabor
02/2000–06/2000	Praktikum bei der Marktgemeinschaft Bodenseeobst eG in Friedrichshafen
02/2001–04/2001	Praktikum bei der Firma IconGenetics AG in Freising-Weihenstephan
11/2003–12/2003	Forschungsaufenthalt am Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Bordeaux-Aquitaine